



TESIS DOCTORAL

Estudio del crecimiento del tejido graso y muscular y de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en tres estirpes de cerdo Ibérico finalizados en dos sistemas de alimentación.

NICOLÁS GARRIDO DE LA OSA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Conformidad de los directores:

Fdo. MERCEDES IZQUIERDO CEBRIÁN

Fdo. JOSÉ ÁNGEL PADILLA PEÑAS

2022



CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital

TESIS DOCTORAL

Estudio del crecimiento del tejido graso y muscular y de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en tres estirpes de cerdo Ibérico finalizados en dos sistemas de alimentación.

NICOLÁS GARRIDO DE LA OSA

Directores: **Mercedes Izquierdo Cebrián y José Ángel Padilla Peñas**

Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura.
Departamento de Producción Animal

Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria. Departamento de
Genética

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

2022



CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital

La Doctora Mercedes Izquierdo Cebrián, Jefa de Sección del Área de Investigación Porcina del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) y el Doctor José Ángel Padilla Peñas, Catedrático de la Facultad de Veterinaria de Extremadura, del Departamento de Producción Animal de la Facultad Veterinaria.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral de título **“Estudio del crecimiento del tejido graso y muscular y de la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en tres estirpes de cerdo Ibérico finalizados en dos sistemas de alimentación”** presentada por Nicolás Garrido de la Osa para optar al grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección, cumple las condiciones exigidas para obtener dicho título y autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste, firman en Cáceres, a 17 de enero de 2022.

MERCEDES IZQUIERDO CEBRIÁN

JOSÉ ÁNGEL PADILLA PEÑAS

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al programa de Ayudas para la Financiación de Contratos Predoctorales (PD18079) con la financiación del Fondo Social Europeo, y a las ayudas para contratos predoctorales de la Fundación Valhondo Calaff.

La dirección de la Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo por la doctora Mercedes Izquierdo Cebrián, Jefa de Sección del Área de Investigación Porcina del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), y por el doctor José Ángel Padilla Peñas, Catedrático de la Facultad de Veterinaria de Extremadura, del Departamento de Producción Animal de la Facultad Veterinaria.

Los resultados que han sido recogidos en la presente tesis doctoral se han presentado en los siguientes congresos:

N. Garrido; F.I. Hernández García; A. González-Bulnes; M.A. Pérez Rodríguez; M. Izquierdo. 2020. Metabolic changes in three Iberian pig strains during the finishing period in two feeding systems. 71st Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, 1-4 diciembre.

M. Izquierdo; N. Garrido; F.I. Hernández García; J. Gudiño; M.A. Pérez Rodríguez; A.I. Del Rosario González. 2019. Evaluation of muscle and fat deposition in three Iberian pig lines in two feeding systems by serial ultrasound scanning. X International Symposium of Mediterranean Pig. Florencia, Toscana, Italia. 16-19 octubre.

M. Izquierdo; F.I. Hernández García; N. Garrido; J. García-Gudiño; Matías, J.; Cuadrado, M.I.; M.A. Pérez Rodríguez. 2018. Changes in carcass and meat traits during the montanera finishing period of Iberian pigs. 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Dubrovnik, Croacia. 27-31 agosto.

N. Garrido; M. Izquierdo; F.I. Hernández García; C. Óvilo; A.I. Del Rosario González;

M.A. Pérez Rodríguez; Matías, J.; Cuadrado, M.I.; Cabeza de Vaca, M.; Núñez Y. 2017. The effect of genotype (Torbiscal, Lampiño, Retinto) and feeding system on the expression of lipogenic genes in the Iberian pig. 4th Fatty Pig Congress. Science. Badajoz, Extremadura, España. 23-25 noviembre.

*M. Izquierdo; F.I. Hernández García; M.A. Pérez Rodríguez; A.I. Del Rosario González; **N. Garrido**; Cuadrado, M.I.; Cabeza de Vaca, M.; Amaro, G. 2017. The effect of Iberian genotype and feeding system in carcass composition of Iberian pigs. 4th Fatty Pig Congress. Science. Badajoz, Extremadura, España. 23-25 noviembre.*

*F.I. Hernández García; M. Izquierdo; López-Parra, M; Del Rosario A.I.; Montero A.; Pérez, M.A.; García-Gudiño, J.; **N. Garrido**. 2016. Carcass and meat traits of different Iberian pig genotypes fed in a traditional extensive system. 9th International Symposium on Mediterranean Pig. Portalegre, Alentejo, Portugal. 3-5 noviembre. Disponible en Internet en:
<<https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3215>>.*

Este trabajo se ha podido desarrollar gracias a los proyectos “Aprovechamiento de recursos genéticos mediante su incorporación sostenible a la cadena de valor del cerdo Ibérico” Grupo Operativo Regional **IBERDEFENSE** y “Desarrollo e implementación de nuevas estrategias alimentarias y de manejo para optimizar la sostenibilidad económica y ambiental de las explotaciones de porcino Ibérico” (Acrónimo: **ESTRIBER**).

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este momento, me gustaría agradecer a todos aquellos que han hecho posible la realización de esta Tesis. En primer lugar, a los compañeros del CICYTEX, en especial al laboratorio de análisis de imagen y al laboratorio de calidad de carne, por su aportación constante a lo largo de todo el trabajo.

A Juan Pedro Rubiales, Agustín Villar y todos los compañeros de Valdequera que sin ellos este trabajo no habría sido posible.

A mis compañeros del grupo de Porcino, Javier García, María Alejo, Lola Ayuso, Sonia Pardo, Anabel del Rosario, Miguel Ángel Pérez y Manuel Morano por estar trabajando conmigo codo con codo durante estos años.

Al grupo SINTREP en especial a Julia Bragado y Luis García por su inestimable ayuda a lo largo de todo este tiempo.

Al departamento de Mejora Genética del INIA-CSIC de Madrid, en especial a Cristina Óvilo por toda su ayuda y su dedicación, a Juan García y María Muñoz por todo lo que me han enseñado, a Rita Benítez y a Yolanda Núñez por todo el tiempo que me ha regalado en el laboratorio.

A mis compañeros de Évora, en especial a Jose M. Martins por abrirme la puerta de su universidad.

A mi director José Ángel Padilla y al grupo de genética de la Facultad de Veterinaria por haber hecho posible este trabajo

Y por supuesto a mi directora Mercedes Izquierdo por todo su apoyo, dedicación y sacrificio durante estos años de doctorado, por toda la formación y por no tirar nunca la toalla y a Francisco Ignacio Hernández por su esfuerzo incansable y por sus buenas ideas durante todos estos años.

A mi padre por ayudarme en todo lo que he necesitado, a mi madre por apoyarme en todo momento, a mi hermano por estar siempre ahí y a Mei por ayudarme a escribir en muchas ocasiones.

A mis amigos de toda la vida, David por aportar siempre su mente crítica, a Nacho por inspirarme a seguir trabajando, a Beto por estar conmigo desde el principio y a Jaime por acompañarme a casa.

A Manu y Sonia por abrirme siempre la puerta de su casa, a Enso por ser siempre él mismo y a Mariu por saber escucharme.

A todos vosotros, GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	15
ÍNDICE DE FIGURAS.....	19
ÍNDICE DE TABLAS.....	23
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	25
Resumen \ Summary	29
1. Introducción General	37
Justificación y objetivos.....	39
2. Antecedentes	43
2.1. El cerdo Ibérico: Origen	45
2.2. Sistema de Producción.....	52
2.3. Situación actual cerdo Ibérico.....	55
2.4. Desarrollo y crecimiento del cerdo Ibérico.....	58
Formación del tejido muscular	58
Tejido adiposo.....	59
Desarrollo de tejidos grasos y factores no genéticos que intervienen	61
Efectos de la genética en el desarrollo de los tejidos grasos y musculares	65
Utilización del ultrasonido para medir la composición grasa y muscular	67
2.5. Metabolismo Lipídico.....	70
Principales ácidos grasos y su procedencia	70
Efectos de la dieta y el genotipo en el metabolismo lipídico.....	74
Parámetros sanguíneos séricos asociados a la deposición grasa.....	76
2.6. Principales genes relacionados con el metabolismo lipídico	79
Descripción de los genes.....	79
Estudios de expresión génica: Efectos de la dieta y el genotipo.....	80
2.7. Transcriptómica	82
Aspectos generales	82
Estudios de transcriptómica en el cerdo Ibérico	84

3. Metodología	87
3.1. Experimento 1: Cambios en los tejidos graso, muscular y sanguíneo en la fase de acabado y expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico	89
Animales y manejo.....	89
Medidas ecográficas de deposición grasa y muscular	91
Análisis de plasma sanguíneo	99
Recogida de muestras y datos en el matadero y la sala de despiece	99
Calidad de carne	100
Extracción de ARN.....	101
Calidad e integridad del ARN	102
Retrotranscripción del ARN	103
Eficiencia génica y PCR cuantitativa (qPCR) de los genes estudiados	103
Genes estudiados.....	105
Análisis estadístico y modelos	107
3.2. Experimento 2: Estudio del transcriptoma del músculo en tres estirpes Ibéricas acabadas en cebo de campo	110
Animales y medidas pre sacrificio.	110
Mediciones y toma de muestras post-sacrificio.....	111
Análisis estadístico.....	112
Extracción de ARN, preparación de la biblioteca y secuenciación	113
Análisis bioinformáticos.....	114
Clasificación funcional de los genes, análisis de redes y rutas.....	115
Validación del ARN seq y análisis estadístico	116
4. Resultados	119
4.1. Resultados del Experimento 1	121
4.1.1. Composición corporal ecográfica durante el acabado	121
4.1.2. Parámetros metabólicos sanguíneos durante el acabado.....	130
4.1.3. Calidad de canal y metabolismo lipídico.....	139
4.2. Resultados del Experimento 2	148
4.2.1. Caracteres de canal, calidad de carne y parámetros metabólicos sanguíneos	148
4.2.2. Estudio del transcriptoma en el músculo <i>Longissimus dorsi</i>	152

5. Discusión General	173
5.1. Composición corporal ecográfica	175
5.2. Parámetros sanguíneos.....	180
Urea.....	180
Triglicéridos.....	182
Lactato	183
Glucosa.....	184
Fructosamina	185
Colesterol	186
Asociaciones entre parámetros sanguíneos.....	187
5.3. Características de la canal, perfil lipídico y expresión génica.....	189
Características de la canal.....	189
Perfil lipídico de la grasa subcutánea	190
Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico	194
5.4. Transcriptoma muscular	200
Grupo génico funcional del colágeno	201
Grupo génico funcional del desarrollo muscular	202
Grupo génico funcional del metabolismo de los lípidos:	207
Genes de factores reguladores.....	209
6. Conclusiones/Conclusions	211
6.1. Conclusiones	213
6.2. Conclusions	215
7. Referencias	217

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los troncos porcinos primitivos adaptado de Clemente et al. (2006).....	46
Figura 2. Primera mención al Torbiscal, (Rold & Laguna, 1992)	48
Figura 3. Origen y formación de las Estirpes de Cerdo Ibérico, adaptado de Clemente et al., 2006	49
Figura 4. Ilustración de las estirpes estudiadas.....	50
Figura 5. Ilustración del Sistema de Montanera	52
Figura 6. Evolución del censo de reproductores Lampiños. Adaptado de AECERIBER	56
Figura 7. Evolución del censo de reproductores de estirpe Torbiscal. Adaptado de AECERIBER	56
Figura 8. Proceso metabólico de β oxidación resumido , adaptado de (Garrett & Grisham, 2008)	72
Figura 9. Metabolismo de distintos ácidos grasos, adaptado de Vessby et al. (2002)	74
Figura 10. Metodología de preparación de librerías para técnicas de RNAseq mediante NGS. Adaptado de (Corney, 2013).	83
Figura 11. Imagen ecográfica longitudinal del LD (Longissimus dorsi) en la que aparece la lengüeta del trapecio	92
Figura 12. Posición para la ecografía transversal del lomo y de las capas de grasa subcutánea dorsal. La marca anaranjada sirve de referencia para hallar la lengüeta del trapecio.	93
Figura 13. Imagen correcta del lomo (chuleta) en la que aparecen las indicaciones de medidas de las tres capas subcutáneas de grasa dorsal, la interna (GDI) la media (GDM) y la externa (GDE). LD: músculo Longissimus dorsi.	94
Figura 14. Imagen ecográfica con las medidas de espesor de la chuleta (ECH) y del área de la chuleta (ACH)	94
Figura 15. Posición de la sonda en la ecografía glútea. Los 2 puntos amarillos marcan la punta del ilion (punta del anca, delante) y la punta del isquion (tubérculo isquiático, atrás). La flecha en el transductor de la sonda indica la parte delantera de la sonda y la dirección craneal en la pantalla del ecógrafo. Imagen de dibujo anatómico modificada de Sisson and Grossman (1995)	96

Figura 16. Ecografía glútea. Medición del espesor de la grasa subcutánea glútea (GGLU) y del espesor o profundidad muscular glútea (EGLU). GM: Glúteo medio. GP: Glúteo profundo. EI: Espina isquiática, promontorio óseo sobre el acetábulo.....	96
Figura 17. Metodología de la imagen ecográfica del músculo semitendinoso. SM: músculo semimembranoso; ST: músculo semitendinoso; BF: músculo bíceps femoral. La flecha roja en la sonda indica su polo anterior y la dirección craneal en la pantalla del ecógrafo. Los 2 puntos amarillos marcan la punta del ilion y del isquion. Imagen de dibujo anatómico modificada de Sisson and Grossman (1995).....	98
Figura 18. Imágenes ecográficas del músculo semitendinoso en las que se aprecia el “triángulo” de lados curvos, la medición (arriba) de la grasa sobre el semitendinoso (GST) y el área del semitendinoso (AST)	99
Figura 19. Diluciones seriadas del Pool 1:20 para obtener un gradiente de concentración.	104
Figura 20. Curva de amplificación agrupada en 4 grupos equidistantes.	105
Figura 21. Diagrama de tipo Mapa String-db	106
Figura 22. Gráfica que representa el crecimiento proporcional de cada medida ecográfica durante la fase de acabado, independientemente del genotipo o sistema de alimentación. EGLU = Espesor del músculo glúteo; GGLU = Espesor de la grasa del glúteo; AST = Área del músculo semitendinoso; GST = Espesor de la grasa a nivel del semitendinoso; ACH = Área de la chuleta; ECH = Espesor de la chuleta; GDI = Espesor de la capa interna de la grasa dorsal; GDM = Espesor de la capa media de la grasa dorsal; GDE = Espesor de la capa externa de la grasa dorsal; GDT = Espesor de todas las capas de la grasa subcutánea dorsal.....	125
Figura 23. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa glútea (GGLUf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.	126
Figura 24. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa del semitendinoso (GSTf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.	127
Figura 25. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa dorsal media (GDMf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.	127
Figura 26. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa dorsal externa (GDEf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.	128

Figura 27. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de las variaciones de la grasa en la zona glútea (GGLUd) y en la zona del semitendinoso (GSTd) durante el acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.	129
Figura 28. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de las variaciones de las capas de grasa subcutánea dorsal media (GDMd), externa (GDEd) y total (GDTd) durante el acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.	129
Figura 29. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los valores de Glucosa después del acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	132
Figura 30. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los cambios de concentración Urea en sangre durante el cebo en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	133
Figura 31. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los incrementos de Triglicéridos durante el acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	134
Figura 32. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los incrementos de Glucosa durante el acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	135
Figura 33. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los incrementos de Fructosamina durante el acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	136
Figura 34. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema del perfil de ácido esteárico (%) (C18:0). L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	142
Figura 35. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema del perfil de ácido linoleico (%) (C18:2). L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	143
Figura 36. Gráfica de las interacciones del perfil de ácidos poliinsaturados (%) (PUFA). L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.	144
Figura 37. Gráfico de la interacción genotipo x sistema del gen ACACA L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.....	146
Figura 38. Gráfico de la interacción genotipo x sistema del gen FASN L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.....	146

Figura 39. Gráfico de la interacción genotipo x sistema del gen ACLY L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.....	147
Figura 40. Genes diferencialmente expresados (DE) en cada comparación L = Lampiño, T = Torbiscal, R = Retinto	153
Figura 41. Genes diferencialmente expresados comunes y no comunes en cada comparación R= Retinto, L = Lampiño, T = Torbiscal.	153
Figura 42. Red enriquecida presente en LvsT involucrada en “Crecimiento y proliferación celular, Desórdenes del tejido conectivo, Desórdenes musculares y esqueléticos.....	160
Figura 43. Red enriquecida presente en LvsR involucrada en “Metabolismo lipídico, Transporte molecular, Bioquímica de moléculas pequeñas”	161
Figura 44. Red enriquecida presente en TvsR involucrada en “Ensamblaje y organización celular, Desarrollo celular, Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético”.....	162
Figura 45. LvsR: Efecto regulador del TNF en la fibrogénesis.	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la dieta	90
Tabla 2. Breve descripción de los genes utilizados en este estudio	106
Tabla 3. Primers de los genes utilizados en la Validación de RNAseq	117
Tabla 4. Medias mínimo-cuadráticas de las medidas ecográficas justo antes de la fase de acabado en las tres estirpes estudiadas.....	121
Tabla 5. Medias mínimo-cuadráticas de las medidas ecográficas pre-sacrificio y el incremento durante el periodo de acabado.	124
Tabla 6. Medias mínimo-cuadráticas de los parámetros sanguíneos en mg/dl antes de la fase de acabado	130
Tabla 7. Medias mínimo-cuadráticas de los valores metabólicos en mg/dl antes del sacrificio y el incremento en este periodo.	131
Tabla 8. Coeficientes de correlación entre los distintos caracteres de deposición grasa al principio y al final del acabado.	137
Tabla 9. Correlación del incremento de caracteres metabólicos durante el acabado.	138
Tabla 10. Medias mínimo-cuadráticas de los caracteres de la canal por genotipo, sistema de alimentación, y la interacción entre ambos	139
Tabla 11. Efecto del genotipo y el sistema de alimentación en los perfiles de ácidos grasos (%) y sus ratios.....	141
Tabla 12. Medias mínimo-cuadráticas de la expresión de los genes estudiados por genotipo y Sistema de alimentación y sus interacciones.....	145
Tabla 13. Medias mínimo cuadráticas de los caracteres de canal y parámetros metabólicos sanguíneos	150
Tabla 14. Medias mínimo cuadráticas de los caracteres de calidad de la carne	151
Tabla 15. Principales genes diferencialmente expresados mencionados en el presente estudio	154
Tabla 16. Análisis Fatigo: rutas GOcc, GObp e InterPro principales	155
Tabla 17. Rutas canónicas principales obtenidas con el software IPA.	157
Tabla 18. Principales redes detectadas con el software IPA.....	159
Tabla 19. TNF como regulador “upstream” por el análisis IPA en las comparaciones estudiadas.....	164

Tabla 20. Validación de 12 genes diferencialmente expresados por RNAseq y su CCC	171
--	-----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACACA = Acetil-CoA carboxilasa α
ACH = Área de la chuleta (lomo)
ACLY = ATP-citrato-liasa
ACOX1 = Acyl-CoA Oxidasa 1
ADN = Ácido desoxirribonucleico
ARN = Ácido ribonucleico
AST = Área del músculo tendinoso
BF = Músculo bíceps femoral
CC = Cebo de Campo
CCC = Coeficiente de correlación de concordancia de Lin
cDNA = ADN complementario
CM = Cebo de *Montanera*
CoA = Coenzima A
COL = Colesterol
C_T = valor adimensional que se considera el ciclo fraccional en la que la señal de fluorescencia supera un umbral definido
-d = diferencias entre los valores al final del acabado y al principio
DE = Diferencialmente expresados
DEG = Genes diferencialmente expresados
dNTPs = Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT = Ditioneitol
ECH = espesor de la chuleta (lomo)
EGLU = Espesor del músculo glúteo
EGR1 = Proteína de respuesta temprana-1
-f = al final de la fase de acabado
F1 = Primera generación filial
FASN = Sintasa de ácidos grasos
FC = Fold change
FE = Hierro
FRU = Fructosamina
GDE = Capa externa de la grasa subcutánea dorsal a la altura de la 10^o costilla
GDI = Capa interna de la grasa subcutánea dorsal a la altura de la 10^o costilla
GDM = Capa media de la grasa subcutánea dorsal a la altura de la 10^o costilla
GDT = Espesor de la grasa subcutánea al completo a la altura de la 10^o costilla
GGLU = Espesor de la grasa subcutánea sobre el músculo glúteo
GIM = Porcentaje de grasa intramuscular
GLM = Modelos Lineales Generalizados
GLU = Glucosa
GM = Glúteo medio
GMD = Ganancia media diaria
GO = Gene ontology
GP = Glúteo profundo
GST = Espesor de grasa subcutánea que cubre el músculo semitendinoso
HDL = Lipoproteína de alta densidad
-i = al inicio de la fase de acabado
IA = Índice aterogénico
IPA = *Ingenuity Pathway Analysis*
IT = Índice trombogénico
Kg = kilogramos

L = Estirpe Lampiña
LAC = Lactato
LC = Longitud de la canal
LD = Longissimus dorsi
LDL = Lipoproteína de baja densidad
LJ = Longitud del jamón
LSM = Medias mínimo-cuadráticas
LvsR = Comparación Lampiño con Retinto
LvsT = Comparación Lampiño con Torbiscal
ME = Enzima málica
MUFA = Ácidos grasos monoinsaturados
n3 = ácidos grasos ω -3
n6 = ácidos grasos ω -6
NGS = Técnicas de secuenciación de nueva generación
PC = Peso de la canal
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa
PJ = Peso del jamón
PS = Peso sacrificio
PT = Proteínas totales
PUFA = Ácidos grasos poliinsaturados
QC = Control de calidad
qF = primer Forward
qPCR = PCR cuantitativa
qR = primer Reverse
R = Estirpe Retinta
RC = Rendimiento de la canal
RD = Real Decreto
RJ = Rendimiento del jamón
RL = Rendimiento del lomo
RNAseq = Técnica de Secuenciación de RNA
RP = Rendimiento de la paleta
RPN = Rendimiento de piezas nobles
RT = Transcripción inversa o retrotranscripción
SCD = Esteroil-coenzima A desaturasa
SFA = Ácidos grasos saturados
SM = Músculo semimembranoso
SNP = Polimorfismo de un nucleótido
SSII = *SuperScript*
ST = Músculo semitendinoso
T = Estirpe Torbiscal
TRI = Triglicéridos
TvsR = Comparación Torbiscal con Retinto
WB = Test de Warner-Bratzler

Resumen \ Summary

RESUMEN

El cerdo ibérico es conocido por la alta calidad de sus productos, sobre todo por su alto porcentaje de grasa intramuscular y su perfil lipídico. Existen varios estudios que comparan las razas convencionales con el cerdo ibérico, pero sólo hay unos pocos que comparan las diferentes estirpes dentro de la raza Ibérica. El objetivo general del presente estudio consistió en caracterizar el metabolismo lipídico, el desarrollo muscular y la expresión génica en tres estirpes de cerdo Ibérico, concretamente la Retinta, la Torbiscal y la Lampiña, en dos sistemas de acabado. Este estudio consta de dos experimentos que se describen a continuación.

En el **Experimento 1** se estudiaron para cada estirpe ciertas medidas ecográficas (indicativas de la deposición grasa y acreción muscular), metabolitos del suero sanguíneo (urea, triglicéridos, lactato, glucosa, fructosamina y colesterol), los caracteres de la canal y el perfil lipídico de la grasa subcutánea, así como la expresión de genes (SCD, ME1, ACACA, FASN, EGR1, ACOX1 y ACLY) implicados en el metabolismo lipídico de la grasa intramuscular del Longissimus dorsi. Se utilizaron 65 cerdos ibéricos (22 Retintos, 23 Torbiscas y 20 Lampiños), que se acabaron en dos sistemas de alimentación: cebo de campo (a base de pienso) y montanera (a base de bellotas).

Comparando los tres genotipos, antes del acabado, la Torbiscal tuvo el lomo más profundo y la capa externa de la grasa dorsal más espesa, mientras que el Retinto tuvo la grasa dorsal y grasa glútea más espesas. Tras el acabado, las diferencias en cobertura grasa se mantuvieron, sin embargo, el Retinto tuvo la mayor profundidad glútea y la Lampiña la mayor área del músculo semitendinoso. En relación con los parámetros sanguíneos, al inicio del acabado, la Lampiña tuvo los mayores niveles de urea y triglicéridos. Al final del acabado, la Retinta tuvo los mayores niveles de

triglicéridos y de glucosa. En cuanto a las características de la canal, la estirpe Torbiscal tuvo los mayores pesos de piezas nobles, y la Retinta el mayor porcentaje de grasa intramuscular. En relación al perfil lipídico, la Retinta tuvo el mayor porcentaje de MUFA, mientras que la Lampiña tuvo el mayor contenido en SFA, PUFA e índices aterogénico, trombogénico y n6/n3. En cuanto a la expresión génica, la Retinta mostró los mayores valores de expresión de varios genes relacionados con el metabolismo lipídico (SCD, FASN y ACLY), con la excepción del ME1 que se expresó más en la estirpe Lampiña.

Comparando los dos sistemas de acabado, hubo mayores espesores de grasa de cobertura tras la montanera que tras el cebo de campo. En este último sistema se detectaron los mayores valores, en comparación con la montanera, de urea, triglicéridos, lactato y glucosa, además de los mayores valores de expresión de los genes ME1, ACACA, FASN, ACOX y ACLY.

En el **Experimento 2** se llevó a cabo el estudio del transcriptoma muscular mediante un análisis RNAseq del lomo de 18 animales de las mismas tres estirpes — 6 Retintos (**R**), 6 Torbiscales (**T**) y 6 Lampiños (**L**) — acabados en cebo de campo. También se recogieron datos fenotípicos de estos animales (mediciones ecográficas, caracteres de la canal, metabolitos sanguíneos y composición de ácidos grasos) para apoyar los resultados del análisis del transcriptoma. Los resultados fenotípicos fueron en su mayoría similares a los obtenidos en el Experimento 1, con algunas variaciones debidas posiblemente a la ausencia del sistema de montanera. Para los análisis informáticos del estudio transcriptómico, las tres estirpes (R, T, L) se agruparon en tres tipos de comparaciones: LvsT, LvsR y TvsR. La técnica RNAseq detectó un total de 17.273, 17.194 y 17.272 genes expresados para LvsT, LvsR y TvsR respectivamente. Tras el filtrado (para detectar los genes diferencialmente expresados), se encontraron 272 genes diferencialmente expresados (**DEG**) para LvsT, con 188 más regulados y 88 menos regulados en Lampiño; 676 DEG para LvsR, con 366 más regulados y 310 menos regulados en Lampiño; y finalmente, 125 DEG para TvsR, con 90 más regulados y 35

menos regulados en Torbiscal. Posteriormente se llevó a cabo el análisis funcional de estos DEGs, para encontrar las más importantes funciones, rutas metabólicas, rutas canónicas y regulaciones de procesos biológicos comparados entre las tres estirpes, obteniendo así diferencias entre ellas en cuanto al metabolismo del colágeno, metabolismo de los lípidos y desarrollo muscular. Así, LvsR fue la comparación con el mayor número de DEGs, correspondientes a rutas de todos los grupos funcionales, pero principalmente las relacionadas con el denominado *grupo del metabolismo de los lípidos*. En la comparación LvsT se encontraron DEGs implicados en rutas de todos los grupos metabólicos o funcionales. Finalmente, la comparación TvsR obtuvo el menor número de DEGs, y correspondieron principalmente a rutas del *grupo del desarrollo muscular*.

En conclusión, los resultados de los dos experimentos descritos sugieren que las tres estirpes estudiadas tienen características diferentes en cuanto a deposición grasa y acreción muscular, perfil lipídico y metabolismo energético, que además se manifiestan de diferente forma según se finalicen en cebo de campo o en montanera. Estas diferencias también se reflejan en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y en las diferentes rutas metabólicas obtenidas mediante el estudio del transcriptoma muscular. Todo ello implica un gran potencial para la aplicación práctica de estos conocimientos a la zootecnia e industria cárnica del cerdo Ibérico, de forma que el productor pueda elegir el genotipo y sistema de finalización más apropiados para adaptarse a las demandas del mercado, y además estos resultados sientan las bases para posteriores estudios de cruzamientos intra-raciales para conseguir una producción más versátil y sostenible.

SUMMARY

The Iberian pig is known for the high quality of its products, especially for its high percentage of intramuscular fat and its lipid profile. There are several studies comparing conventional breeds with the Iberian pig, but there are only a few that compare the different strains within the Iberian breed. The overall objective of the present study was to characterise lipid metabolism, muscle development and gene expression of three Iberian pig strains, namely Retinta, Torbiscal and Lampiña, in two finishing systems. This study consists of two experiments which are described below.

In **Experiment 1**, Sixty-five Iberian pigs (22 Retintos, 23 Torbiscales and 20 Lampiños) were finished in two systems: a concentrate-based diet (*cebo de campo*) and an acorn-based diet (*montanera*). This experiment involved a study of ultrasound measurements (related to fat deposition and muscle accretion), blood serum metabolites (urea, triglycerides, lactate, glucose, fructosamine and cholesterol), carcass traits and carcass profile, carcass traits and subcutaneous fat lipid profile, as well as the expression of genes (SCD, ME1, ACACA, FASN, EGR1, ACOX1 and ACLY) involved in the lipid metabolism of intramuscular fat in *Longissimus dorsi* for each strain in the two finishing systems.

Comparing the three genotypes, before finishing, the Torbiscal strain had the thickest loin and the thickest outer layer of back fat, while Retinto animals had the thickest back fat and gluteal fat. After finishing, Retinto had the greatest gluteal depth and Lampiño the greatest semitendinosus muscle area. In relation to blood parameters, at the beginning of finishing, the Lampiño strain had the highest levels of urea and triglycerides. At the end of finishing, the Retinto had the highest levels of triglycerides and glucose. In terms of carcass traits, the Torbiscal strain had the highest carcass weight and the Retinto had the highest percentage of intramuscular fat. Regarding lipid profile, Retinto had the highest percentage of MUFA, while Lampiño had the highest content of SFA, PUFA and atherogenic, thrombogenic and n6/n3

indices. In terms of gene expression, Retinto showed the highest expression values for several genes related to lipid metabolism (SCD, FASN and ACLY), with the exception of ME1 which was expressed more in the Lampiña strain.

Comparing the two finishing systems, there were higher fat cover thicknesses in *montanera* animals than in concentrate-based finished animals. In these animals were detected the highest values of urea, triglycerides, lactate and glucose, as well as the highest expression values of the ME1, ACACA, FASN, ACOX and ACLY genes in comparison with the *montanera* finishing.

In **Experiment 2**, the study of the muscle transcriptome was carried out by RNAseq analysis of the loins of 18 animals from the same three strains: 6 Retintos (**R**), 6 Torbiscales (**T**) and 6 Lampiños (**L**) following a concentrate-based finishing. Phenotypic data (ultrasound measurements, carcass traits, blood metabolites and fatty acid composition) were also collected from these animals to support the results of the transcriptome analysis. The phenotypic results were mostly similar to those obtained in Experiment 1, with some variations possibly due to the absence of the *montanera* system. For the computer analyses of the transcriptome study, the three strains (R, T, L) were grouped into three types of comparisons: LvsT, LvsR and TvsR. The RNAseq technique detected a total of 17,273, 17,194 and 17,272 expressed genes for LvsT, LvsR and TvsR respectively. After filtering (to detect differentially expressed genes), 272 differentially expressed genes (DEGs) were found for LvsT, with 188 up-regulated and 88 down-regulated in Lampiño; 676 DEGs for LvsR, with 366 up-regulated and 310 down-regulated in Lampiño; and finally, 125 DEGs for TvsR, with 90 up-regulated and 35 down-regulated in Torbiscal. Subsequently, functional analysis of these DEGs was carried out to find the most important functions, metabolic pathways, canonical pathways and regulations of biological processes compared between the three strains, thus obtaining differences between them in terms of collagen metabolism, lipid metabolism and muscle development. Thus, LvsR was the comparison with the highest number of DEGs, corresponding to pathways of all

functional groups, but mainly those related to the so-called lipid metabolism group. In the LvsT comparison, DEGs were found to be involved in pathways of all metabolic or functional groups. Finally, the TvsR comparison yielded the lowest number of DEGs, and they mainly corresponded to pathways from the muscle development group.

In conclusion, the results of the two experiments described suggest that the three strains studied have different characteristics in terms of fat deposition and muscle accretion, lipid profile and energy metabolism, which are also manifested in different ways depending on whether they are finished in *montanera* or in *cebo de campo*. These differences are also reflected in lipid gene expression and in the different metabolic pathways of the muscle transcriptome. All this implies a great potential for the practical application of this knowledge to the breeders and the meat industry of the Iberian pig, so that the producer can choose the most appropriate genotype and finishing system to adapt to the demands of the market, and these results also lay the foundations for further studies of intra-racial crossbreeding to achieve a more versatile and sustainable production.

1. Introducción General

Justificación y objetivos

Debido a la excelente calidad de su carne, tanto fresca como curada, el cerdo Ibérico ha pasado de ser una producción de tipo familiar a ser un sector organizado con una gran importancia económica para las regiones del sudoeste de la península Ibérica, incluyendo al cerdo Alentejano, muy próximo genéticamente. El cerdo Ibérico es una raza muy heterogénea, puesto que cuenta con cinco estirpes reconocidas por el MAPA que son: Torbiscal, Retinto, Lampiño, Entrepelado y Manchado de Jabugo. De estas estirpes, la Torbiscal, la Lampiña y el Manchado de Jabugo se consideran variedades de protección especial, mientras que las otras (Retinta y Entrepelado) se contemplan como variedades de fomento (RD 45, 2019).

Es importante considerar también los sistemas de producción en los que se explota el cerdo Ibérico. El sistema de alimentación es fundamental a la hora de caracterizar los productos del cerdo Ibérico, y la hora de la conservación del medio ambiente, el sistema de montanera (a base de bellotas y hierba) juega un papel fundamental, tanto en la biodiversidad como en la sostenibilidad del ecosistema (Lopez-Bote, 1998). Se reconocen oficialmente tres sistemas según la norma de calidad de los productos del cerdo Ibérico (RD 4/2014): intensivo, extensivo (cebo de campo) y extensivo de montanera.

Debido a toda esta variabilidad genética en la raza Ibérica y a lo distinto de sus sistemas de cría y acabado, se ha planteado la necesidad de caracterizar estas estirpes y analizar cómo se desenvuelven en los distintos sistemas de alimentación, necesidad que ha sido corroborada por los Sectores agroindustriales implicados. Diferentes autores han estudiado la calidad de la carne de las estirpes de cerdo Ibérico y sus cruces (Clemente et al., 2012; Izquierdo, Hernández-García, Lopez-Parra, et al., 2018; Juárez, Clemente, Polvillo, & Molina, 2009), así como las diferencias entre el cerdo Ibérico y las razas comerciales como la Landrace y Large-White (Almeida et al., 2019; Morales, Baucells, Pérez, Mourot, & Gasa, 2003) o la Duroc (Andrés et al., 2001).

También se ha estudiado la importancia del sistema de alimentación en el cerdo Ibérico (D. Ayuso, González, Hernández, Peña, & Izquierdo, 2014; Morcuende, Estévez, Ruiz, & Cava, 2003; Rey, Daza, López-Carrasco, & López-Bote, 2006) y la importancia productiva de los cruces entre estirpes (Ibáñez-Escriche, Magallón, Gonzalez, Tejeda, & Noguera, 2016; Ibáñez-Escriche, Varona, Magallón, & Noguera, 2014). Asimismo, se han estudiado las diferencias a nivel genético de las distintas razas porcinas, incluido el cerdo Ibérico (María Muñoz, Bozzi, et al., 2018; Poklugar, Čandek-Potokar, Lukač, Tomažin, & Škrlep, 2020) y los cruces de este último con razas comerciales (G. Muñoz et al., 2007). Además, se han utilizado las nuevas tecnologías de secuenciación para ahondar en el estudio del transcriptoma y la expresión génica del cerdo Ibérico (M. Ayuso et al., 2016a; Benítez et al., 2018, 2019; Óvilo et al., 2014; Villaplana-Velasco et al., 2021). Sin embargo, muy pocos estudios incluyen a la estirpe Lampiña, y ninguno todavía, hasta donde sabemos, ha estudiado y comparado de forma simultánea las diferentes estirpes del cerdo Ibérico en sus diferentes sistemas de alimentación.

Así pues, para intentar contribuir a un más profundo conocimiento en este área de investigación y satisfacer las necesidades del Sector agroindustrial del Ibérico, los trabajos que conforman la presente Tesis Doctoral han estudiado tres estirpes de cerdo Ibérico, de un lado el Lampiño y Torbiscal, como representantes de las variedades de protección especial, y de otro el Retinto como representante de las variedades de fomento, y las tres se han estudiado en los dos sistemas de alimentación más comunes para la raza Ibérica en pureza, el Cebo de Campo y el Extensivo de Montanera. De esta forma, y apoyándonos en previos estudios, en el presente trabajo se integraron una serie de variables relacionadas con la acreción muscular y la deposición grasa obtenidas mediante la ecografía de composición corporal realizada antes y después del cebo. También se estudió la calidad de la canal, el porcentaje de grasa intramuscular y el perfil lipídico de la grasa subcutánea. Así mismo se obtuvieron datos de metabolitos sanguíneos tales como urea, triglicéridos, lactato, glucosa, fructosamina y colesterol antes y después del acabado. Todo ello se complementó con un estudio de expresión de los genes involucrados en el metabolismo lipídico, que se

relacionaron con los caracteres fenotípicos evaluados *in vivo* y *postmortem*. Finalmente, el trabajo se completó con un estudio del transcriptoma del músculo *Longissimus dorsi* para averiguar cómo se relacionan los genes entre sí y las rutas que conforman en las distintas estirpes.

Los resultados de estos estudios permitirán transferir al sector productivo e industrial del porcino Ibérico una información importante que podrá utilizarse para crear protocolos específicos de manejo y alimentación dependiendo la estirpe que se pretenda utilizar para obtener el tipo de producto que demande el mercado. La explotación de las diferentes estirpes presentará una calidad tipificada dentro del 100% Ibérico que facilitará la exportación de dichos productos. También será posible orientar cruces dirigidos entre estirpes para mejorar la calidad de los productos o los rendimientos productivos aprovechando el efecto de la heterosis pero sin utilizar animales que no sean Ibérico en pureza. Por otro lado, estos estudios ayudarán a preservar las estirpes con menos difusión y en peligro de extinción, como la Lampiña, ya que se dará a conocer el potencial genético que aportan estas estirpes cuando se crucen con otras más utilizadas o incluso con razas comerciales.

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto en cuanto al estado actual del conocimiento en esta área, la problemática científica, ganadera e industrial a resolver y el plan de trabajo recién esbozado, los objetivos de la presente Tesis Doctoral se pueden enunciar como sigue:

El **objetivo general** consiste en caracterizar la composición y calidad de la canal, el metabolismo lipídico, y la expresión génica relacionada en tres estirpes de cerdo Ibérico, concretamente la Retinta, la Torbiscal y la Lampiña, en dos sistemas de alimentación, para así poder identificar las debilidades y fortalezas productivas de cada una de ellas, de modo que los productores puedan decidir qué estirpe es mejor para cada tipo de explotación.

Para poder alcanzar este objetivo general, es necesario conseguir los **objetivos específicos** siguientes:

1. Comparar la deposición grasa y acreción muscular y sus cambios mediante ecografía antes y después del acabado entre las tres estirpes (Retinto, Torbiscal y Lampiño) en los dos sistemas de alimentación (cebo de campo y montanera).

2. Comparar los parámetros sanguíneos metabólicos (urea, triglicéridos, fructosamina, colesterol, lactato y glucosa) al principio y al final del acabado en las tres estirpes y en los dos sistemas de alimentación.

3. Comparar la calidad de la canal y los perfiles de ácidos grasos de las tres estirpes en los dos sistemas productivos.

4. Comparar la expresión de los genes más importantes que regulan el metabolismo de los lípidos (ACACA, ME1, SCD, EGR1, ACOX1, ACLY y FASN) en las tres estirpes de cerdo ibérico en los dos sistemas de alimentación.

5. Caracterizar el transcriptoma del músculo *Longissimus dorsi* en las tres estirpes alimentadas en cebo de campo, identificando los genes diferencialmente expresados en ellas al compararlas dos a dos.

6. Caracterizar la regulación, las rutas y las redes metabólicas de los genes diferencialmente expresados en cada estirpe en un sistema de cebo de campo.

2. Antecedentes

2.1. El cerdo Ibérico: Origen

Los primeros hallazgos genéticos y arqueológicos de los cerdos domésticos datan de alrededor de 9000 a 10000 años antes de cristo, en muchos sitios de Europa y Asia, con su consecuente extensión al resto del mundo. El desarrollo de estas líneas primitivas a lo largo del tiempo dio lugar a los ancestros de las razas actuales del cerdo Ibérico (Amills, Clop, Ramírez, & Pérez-Enciso, 2010).

Las razas del cerdo doméstico actual derivan de cuatro subgéneros prehistóricos que se diferenciaban tanto en caracteres morfológicos como en área de influencia y difusión. De esta manera aparecieron cuatro líneas diferenciadas: la Asiática (*Sus striatus vitatus*), Céltica (*Sus scrofa ferus*), Indonésica (género *Eusus*) e Ibérica (*Sus mediterraneus*). En España hemos recibido la influencia de dos de estas líneas ancestrales. Así, el *Sus scrofa ferus* (tronco Céltico), considerado como el representante del cerdo europeo que penetró de forma descendente desde la zona de los Pirineos, dio lugar a las siguientes razas actuales: el cerdo Celta en Galicia, el Chato Vitoriano en Álava, y el Cerdo de Vich del pirineo catalán, entre otras. Contrariamente, el *Sus mediterraneus* invadió España en sentido ascendente, desde el litoral Mediterráneo hacia el centro de la península. Este porcino existía prehistóricamente en todas las regiones que rodean este mar, y en su avance se asentó en Andalucía, Extremadura, Levante y la meseta Castellana, dando lugar a las estirpes Ibéricas actuales (Dieguez, 2000a).

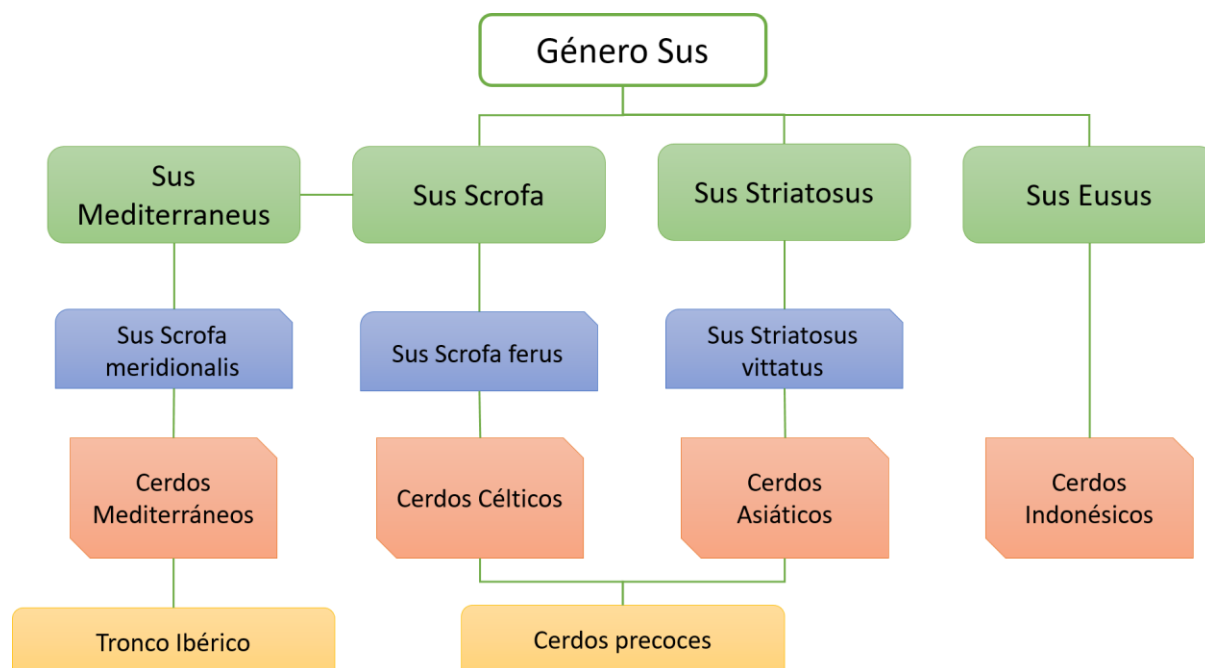


Figura 1. Esquema de los troncos porcinos primitivos adaptado de Clemente et al. (2006).

El cerdo Ibérico actual y el cerdo negro Mallorquín constituyen una “Agrupación racial” con gran diversidad interna llamada el Tronco Ibérico. Esta agrupación a su vez se divide en líneas y estirpes con semejanza en sus principales caracteres morfofuncionales (Clemente et al., 2006). El Tronco Ibérico es resultado de la adaptación del *Sus mediterraneus* al ecosistema de bosque mediterráneo peninsular caracterizado por especies arbóreas del género *Quercus*. Por este motivo, el cerdo Ibérico se ha convertido en el principal responsable del mantenimiento del ecosistema de dehesa, y se diferencia del resto de las razas explotadas en España en su rusticidad y elevada adaptación al medio, así como en su sistema productivo extensivo.

El tronco Ibérico se clasificó por primera vez en 1944 (Aparicio Sanchez, 1944) y se fue actualizando en años posteriores para determinar las siguientes variedades:

Variiedad Negra: Dentro de esta agrupación existen animales con ausencia de pelo, llamados Negros Lampiños, y animales con pelo, llamados Negros Entrepelados. Se describían como animales con gran propensión al depósito graso y con rendimiento más bajo en comparación con otras variedades de cerdo Ibérico.

Variedad Colorada: Es la variedad más abundante, se extiende principalmente por Extremadura y Andalucía. La capa puede variar del colorado al retinto oscuro.

Variedad Rubia: Se encuentra sobre todo en Andalucía. Pese a llamarse Rubia, este grupo incluye individuos con pigmentación blanquecina, que constituyen a su vez la conocida como variedad cana. Otros individuos tienen una pigmentación que les da una tonalidad dorada.

Variedad Manchada: Posiblemente la menos numerosa de España. Se concentran en Huelva, cerca de Jabugo. Es una variedad resultante del cruce entre individuos de las variedades Rubia, Negra y otras. Son animales precoces y corpulentos que tienen como característica principal una capa rubia salpicada de manchas negruzcas por todo el cuerpo.

En el 1984, Buxadé Carbó actualizó la clasificación y agrupó todas las estirpes en dos grandes grupos, las **Variedades Negras** y las **Variedades Coloradas** que a su vez se dividían en Lampiño y Entrepelado las negras y Colorada Extremeña o Retinto, Rubia o campiñesa y Manchado de Jabugo las Coloradas.

La siguiente modificación vino de manos de Elena Diéguez Garbayo en 1992 que mantuvo el criterio del color de la capa y la presencia o ausencia de pelo para ampliar la antigua selección añadiendo nuevas líneas a las ya mencionadas.

Es importante resaltar el nacimiento de la estirpe Torbiscal, surgida de la fusión en 1963 de cuatro líneas mantenidas en aislamiento reproductivo durante dos décadas en la finca el Dehesón del Encinar con la dirección de D. Miguel Odriozola. Estas castas eran las portuguesas Ervideira y Caldeira, y las españolas Campanario y Puebla. La estirpe portuguesa Ervideira procedía de la ganadería del Conde de Ervideira, en Évora. Eran cerdos de gran formato, de crecimiento tardío, de capa rubia, representantes del Dorado Alentejano y del Rubio Andaluz. Caldeira, la otra estirpe portuguesa, tenía una capa retinta, eran animales rústicos de formato longilíneo y buen aplomo. Tienen su origen en la ganadería de Picao Caldeira en Elvas. De las líneas

españolas, Campanario estaba constituida por cerdos Negro Lampiños que se conocían como “Lampiño de la Serena”. Eran animales también rústicos de destacado desarrollo óseo y procedían de la ganadería de los hermanos Donoso en Campanario de la provincia de Badajoz. Por otra parte, Puebla era un Negro Lampiño de las Vegas del Guadiana, también llamado Pelón Guadinanés, un cerdo muy graso y extremadamente fino. Provenían de Puebla de la Calzada, también de Badajoz, de la ganadería de D. Fabián Lozano (Clemente et al., 2006).

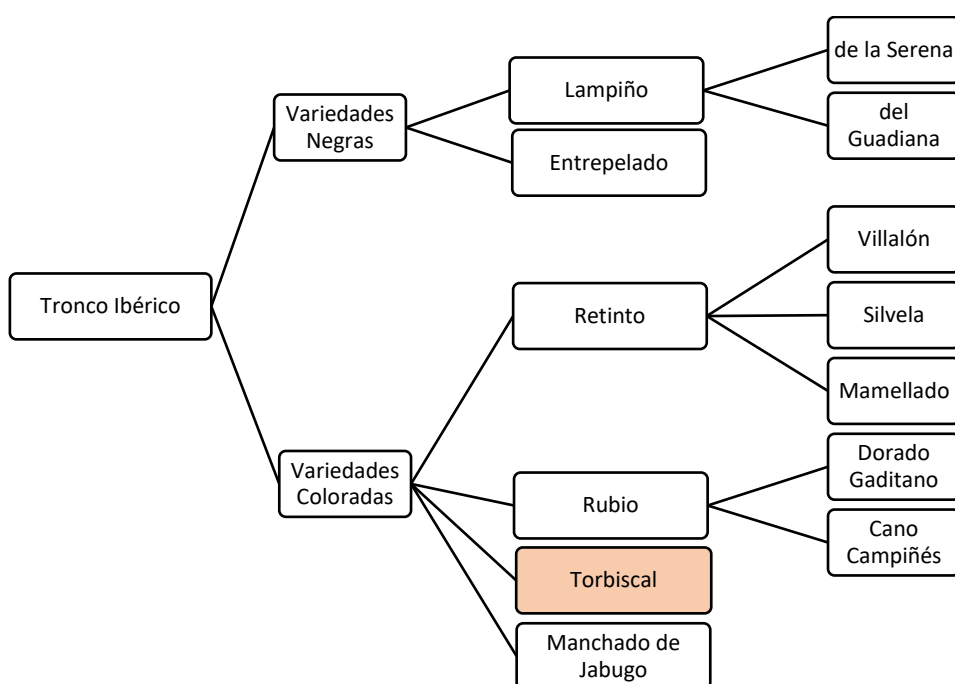


Figura 2. Primera mención al Torbiscal, (Rold & Laguna, 1992)

La Asociación Española de Criadores de Cerdo Ibérico (AECERIBER) junto con el departamento de Genética de la Universidad de Córdoba en 2001 presentan una nueva clasificación que deja atrás la clasificación únicamente por color de capa y ausencia y presencia de pelo, usando una distinción geográfica de las estirpes organizando entre estirpes españolas y estirpes portuguesas. En esta clasificación se muestra por primera vez la línea Valdesequera perteneciente a la estirpe Retinta.

Las líneas de Retinto actuales surgen a principios del siglo XX de una línea conocida como “retinto mejorado”, que se origina del cruce de verracos retintos

portugueses y hembras de retintas extremeñas originarias de la ganadería de la viuda de Montero de Espinosa. A partir de esta línea mejorada se originarán por selección en núcleo cerrado la estirpe Villalón, mientras que otra estirpe, la Silvela, se desarrollará por cruzamiento de este retinto nuevamente con verracos portugueses. Esta última estirpe será la base de la que surgirá la línea Valdesequera a principio de los años 80. La línea Censyra nace de la fusión de las líneas Silvela y Villalón (Clemente et al., 2006). Muchas líneas claramente definidas hoy en día han sido resultantes de la combinación de dos o más líneas de la misma o de otra variedad (**Figura 3**).

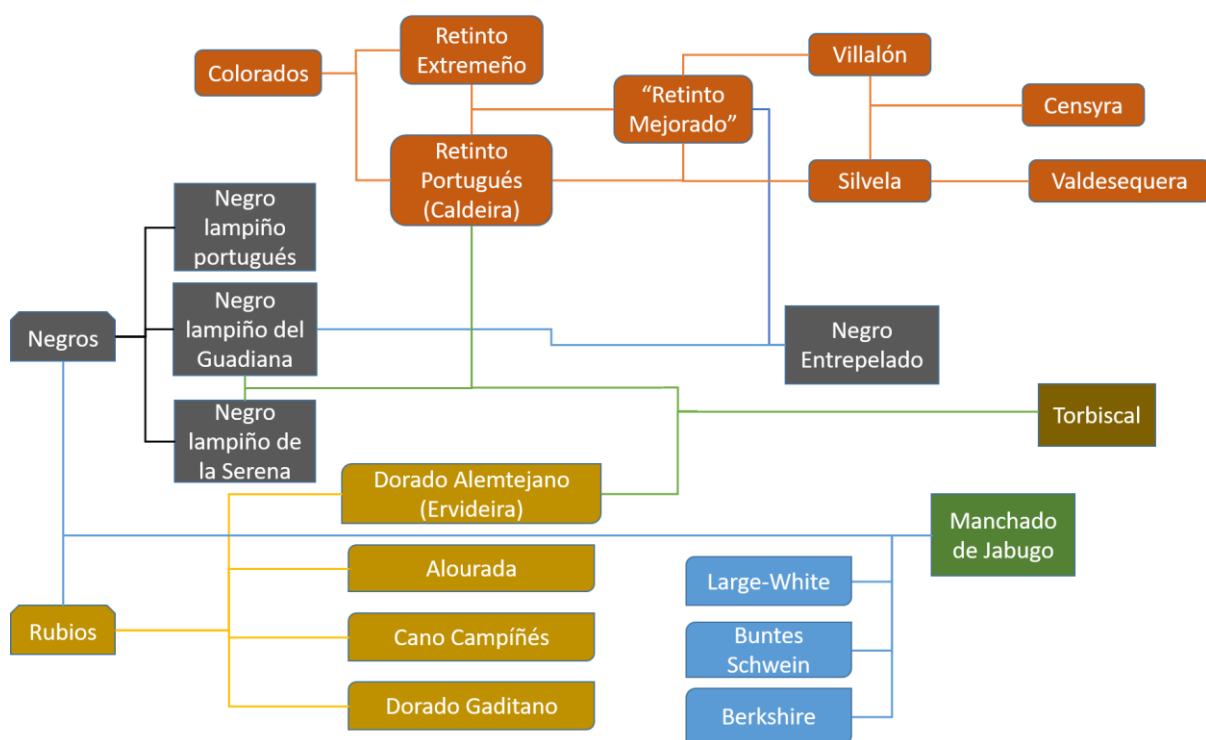


Figura 3. Origen y formación de las Estirpes de Cerdo Ibérico, adaptado de Clemente et al., 2006

En la **Figura 3** se puede comprender de forma mucho más visual la clara diversidad genética que tienen estirpes como la Torbiscal, procedente de la unión de las variedades coloradas, negras y rubias. O también se puede valorar el carácter rústico y ancestral de estirpes como la Lampiña, tan poco modificada al cabo de los años. Y líneas como la Valdesequera, que han ido formándose cruzando estirpes

únicamente de la variedad colorada. En la **Figura 4** están representadas las tres estirpes estudiadas la presente Tesis Doctoral.



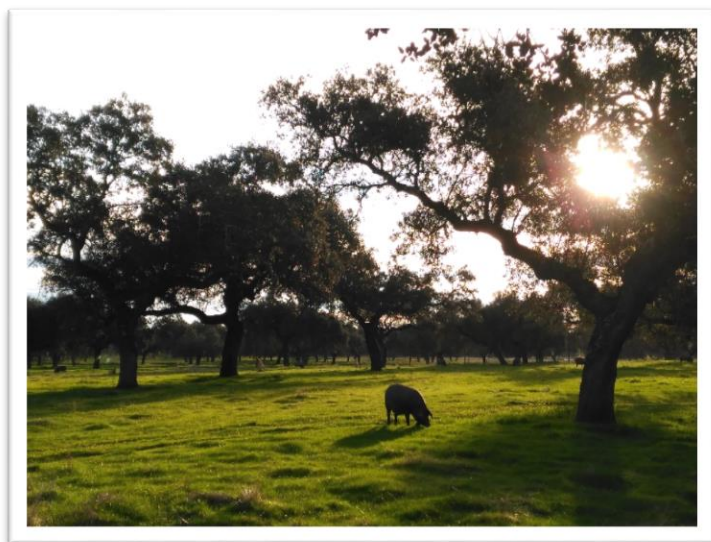
Figura 4. Ilustración de las estirpes estudiadas.

Actualmente se están realizando estudios de secuenciación en búsqueda de SNPs para esclarecer las relaciones filogenéticas entre las distintas estirpes y entre el cerdo Ibérico y el resto de razas de cerdo europeo (M. Muñoz et al., 2019), y se ha confirmado que el cerdo Ibérico y el cerdo portugués Alentejano están muy relacionados con el jabalí, demostrando así el carácter rústico de estas razas. En base a estos estudios y otros más (María Muñoz, Bozzi, et al., 2018), se sabe que la raza de cerdo Alentejano está muy relacionada con el cerdo Ibérico, y se ha visto que tiene un comportamiento similar en los sistemas de finalización tradicionales (J. M. Martins et al., 2021). Otra línea de investigación interesante es la realizada por Ramírez et al. (2015) que han analizado la información genómica de una muestra perfectamente conservada de un cerdo del siglo XVI, y, comparando el genoma mitocondrial y autosómico de esta raza ancestral, se ha descubierto que está muy emparentada con la raza Ibérica actual y con el jabalí europeo, estando así en concordancia con los estudios de M. Muñoz et al. (2019), además de la ausencia de influencia genética de razas porcinas procedentes del tronco asiático, confirmando su escasa o nula aportación a la raza Ibérica actual. También se ha analizado el origen genético de algunas estirpes como la Torbiscal (Rodríguez-Valdovinos, García-Casco, García-Ruiz,

Núñez-Moreno, & Silió-López, 2019) para conocer la aportación de cada una de las estirpes fundadoras, así como las diferencias con otras estirpes o con otras razas como la Duroc.

2.2. Sistema de Producción

El sistema de producción del cerdo Ibérico históricamente ha estado orientado principalmente a la elaboración de productos curados que puedan almacenarse y consumirse durante todo el año. Sin embargo, actualmente los productos cárnicos frescos tienen un hueco en el mercado gracias a su gran calidad. Para realizar los curados en seco de los productos como el jamón, la carne debe permanecer en frío durante las primeras fases del procesado, de forma que la sal pueda difundirse correctamente por el producto y así obtener unos niveles de actividad de agua que permitan un desarrollo correcto de la maduración sin proliferación de microorganismos anaerobios. Por lo tanto, el punto crítico de la producción tradicional del cerdo ibérico era que el sacrificio tenía que realizarse durante el invierno. La maduración de las bellotas en la dehesa ocurre desde noviembre hasta febrero aproximadamente, que coincide exactamente con la fase de engorde del cerdo Ibérico, haciendo patente la estrecha relación que tiene esta raza con la dehesa (Lopez-Bote, 1998). Este tipo de cebo da lugar al sistema de *Montanera*, que se define



como un sistema de acabado en libertad típico del suroeste de la Península Ibérica en el que los cerdos ibéricos se alimentan de bellotas (principalmente de encina *Quercus rotundifolia*) y pastos de la dehesa (pastizales poco arbolados derivados del bosque mediterráneo) (**Figura 5**).

Figura 5. Ilustración del Sistema de Montanera

Los animales se preparan durante la fase de crecimiento para poder entrar en la montanera con una edad aproximada de 10-12 meses y sobre 100 kg de peso. Hasta ese momento, durante el periodo de acabado, la alimentación cambia progresivamente desde una dieta restringida (alrededor de 1,8 Kg/cabeza/día) a una *ad libitum* (normalmente 5-6 Kg/cabeza/día de concentrado, o más si se alimenta de bellota), y la composición del alimento puede cambiar de un concentrado equilibrado en energía/proteína a una dieta basada bellota y pastos (sistema extensivo de Montanera) o se mantiene con una dieta de concentrado (sistema de cebo). La bellota tiene un alto contenido en hidratos de carbono y un bajo contenido en proteínas, y es más rica en MUFA que las dietas de acabado convencionales (Cantos et al., 2003; Tejerina, García-Torres, Cabeza De Vaca, Vázquez, & Cava, 2012). De toda la dehesa, el cerdo aprovecha principalmente la bellota y la hierba siendo un 56,5 y un 43,3% de su dieta respectivamente (Rodríguez-Estévez, García, Peña, & Gómez, 2009).

El cerdo Ibérico alcanza un peso vivo de 140-170kg antes de sacrificarse, debido a que estos animales para tener la calidad que les caracteriza necesitan una cobertura grasa muy espesa. Tradicionalmente se seleccionaban animales con mayor cobertura grasa ya que era una de las principales fuentes energéticas durante el año. Sin embargo, las razas comerciales se han seleccionado para obtener una carne más magra, que tiene un mayor valor económico. Debido al gran peso vivo que tienen que alcanzar estos animales para llevarse a matadero, podía darse el caso de que el número de animales alimentados en la dehesa supere la producción de bellota y acaben las reservas naturales antes de que alcancen su peso máximo. Cuando esto ocurre, antes de que existiera la norma de calidad del cerdo Ibérico actual (RD 4/2014) se recurría al llamado “recebo”, que consistía en suplementar el acabado con piensos formulados hasta que alcancen el peso de matadero. Sin embargo, esto afectaba negativamente a la calidad de los productos, y por consiguiente, al precio de las piezas (Lopez-Bote, 1998).

Debido al reducido número de animales que se pueden finalizar con este sistema, muchos cerdos Ibéricos se ceban en grandes corrales (cebo de campo) o en naves (cebo intensivo) con piensos con diferentes formulaciones de oleico (Ventanas *et al.*, 2008). En la estirpe Alentejano, Martins *et al.*, (2015) estudiaron los efectos de distintas dietas en diferentes sistemas de finalización sobre los caracteres de canal y perfiles lipídicos, sin embargo, no hemos encontrado estudios que comparen las tres estirpes planteadas en este proyecto en los dos sistemas de alimentación.

2.3. Situación actual cerdo Ibérico

El cerdo Ibérico actual se caracteriza por una mayor capacidad de acumulación de grasa subcutánea e intramuscular con un alto contenido en MUFA, adquiriendo sus productos cárnicos unos excelentes atributos organolépticos (García-Gudiño *et al.*, 2021; Serra *et al.*, 1998). Este metabolismo de la grasa característico del tronco Ibérico se debe principalmente a su genética (Ruiz Carrascal & Lopez-Bote, 2002) y a su particular sistema de alimentación y cría (Rey *et al.*, 2006). La producción de carne ibérica se comercializa siguiendo una normativa específica (Norma de Calidad del Cerdo Ibérico; RD 4/2014) que describe los requisitos de edad y peso según el genotipo y el sistema de alimentación y cría durante el engorde. Esta norma define tres genotipos (Ibérico puro y Duroc x Ibérico al 50% y al 75%) además de tres tipos de sistemas de acabado: intensivo, cebo de campo y montanera (García-Gudiño *et al.* 2021).

La producción de cerdo ibérico incrementó su censo de forma significativa en los últimos años, lo que demuestra un gran interés en estos productos de alta calidad. A partir de los censos de MAPA de los animales registrados en el libro genealógico, podemos extraer que a finales de 2018 había un total de 741.685 animales inscritos, de los cuales 541.558 son hembras reproductoras. Este número de animales registrados siguió aumentando en los años siguientes hasta registrarse a finales de 2020 un total de 818.273 animales, y 604.583 hembras reproductoras. Este cambio ha sido principalmente por un incremento en el número de animales por ganadería, en lugar de un aumento del número total de ganaderías, ya que los datos de finales de 2018 registraban 5.712 ganaderías con un promedio de 129,51 animales, y los datos de finales de 2020 reducían el número de ganaderías a 5.309 pero aumentaba su promedio de animales a un 154,42.

En cuanto a las estirpes estudiadas de protección especial, la Lampiña y la Torbiscal, se han recogido sus censos del anuario de AECERIBER de 2019, observando que la estirpe Lampiña está experimentando un crecimiento constante en el número

de hembras reproductoras, manteniendo el número de machos estables desde el 2015 (Figura 6)

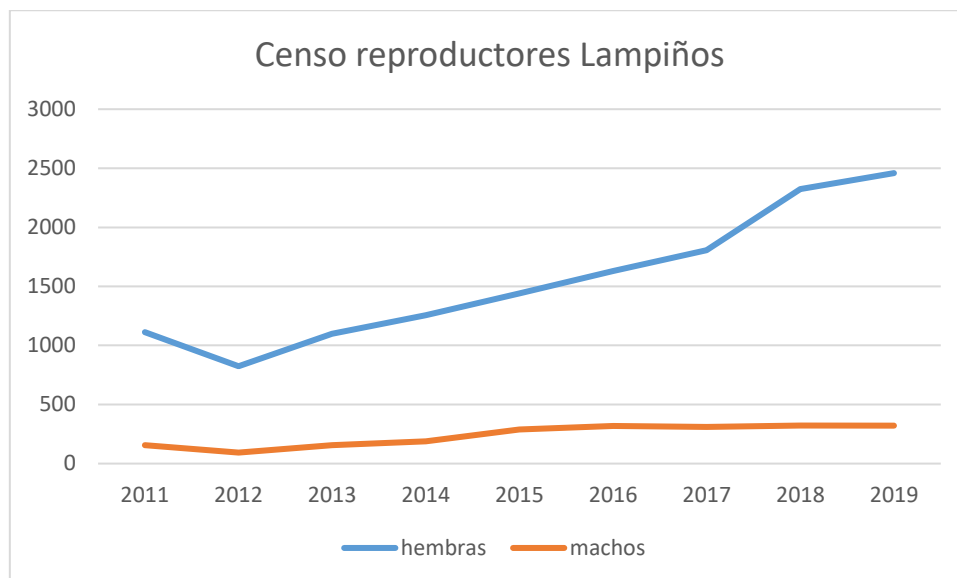


Figura 6. Evolución del censo de reproductores Lampiños. Adaptado de AECERIBER

En el caso de la estirpe Torbiscal, se registró un gran incremento en el 2013, pero desde entonces el censo de reproductores tanto machos como hembras se ha mantenido constante hasta el 2019 (Figura 7)

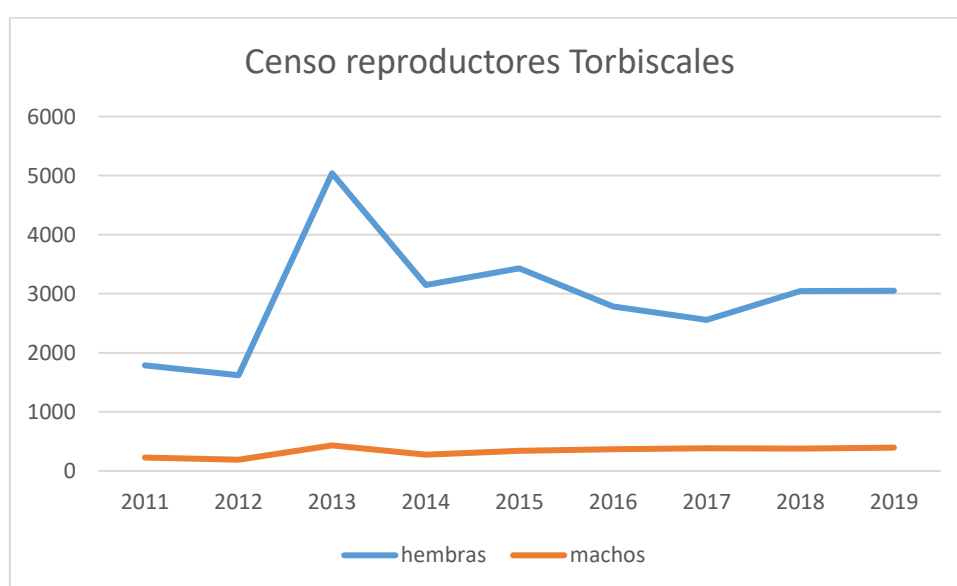


Figura 7. Evolución del censo de reproductores de estirpe Torbiscal. Adaptado de AECERIBER

También es interesante remarcar, que según datos de ASICI, el 63% de los animales sacrificados de bellota en el año 2020/2021 han sido 100% Ibéricos, siendo un 9% el 75% Ibérico y un 28% el 50% Ibérico de un total de 682.935 animales de montanera. Esto demuestra que los ganaderos tienden a usar mayormente ibérico puro para el cebo de montanera lo que hace que estudios como el que propone esta Tesis tengan una gran importancia. El número total de animales sacrificados de cerdo Ibérico ha aumentado también en gran medida en los últimos años. Se registraron según ASICI en 2011 unos 2.832.962 animales sacrificados según la norma de calidad, que aumentó hasta unos 3.810.199 en el 2020.

2.4. Desarrollo y crecimiento del cerdo Ibérico

De forma muy simplificada, el crecimiento es un aumento en el tamaño del animal, y la forma más sencilla y precisa de medir este aumento de tamaño es determinar el peso del animal. Sin embargo, además del aumento del tamaño, el crecimiento también engloba un cambio en la composición de los tejidos. Estos cambios no tienen por qué verse acompañados de un aumento en el tamaño, de hecho, se suelen dar con más frecuencia cuando el animal alcanza el tamaño final (Mitchel, Scholz, & J. Mersmann, 2001).

Formación del tejido muscular

El crecimiento graso y muscular es una de las características que más se han estudiado en los animales domésticos debido a su estrecha relación con el rendimiento económico (Maryline Kouba & Sellier, 2011; Wagner, Schinckel, Chen, Forrest, & Coe, 1999). El tejido muscular animal se ha convertido en la principal fuente de proteína en la dieta de muchas culturas, sobre todo por su valor nutritivo, sus efectos beneficiosos para la salud y su palatabilidad.

El tejido muscular está compuesto de forma basal por fibras musculares. También se compone de fibroblastos, adipocitos, células endotelio-capilares, y células satélites. Durante el desarrollo embrionario, muchos genes intervienen en la diferenciación de las células precursoras de las fibras musculares. En el cerdo, la diferenciación de fibroblastos a mioblastos se da a los 20 días de gestación. A medida que avanza la gestación, estos mioblastos se dividen y el tejido muscular aumenta. Los mioblastos se fusionan entre sí para formar miotubos primarios que a su vez se rodean de miotubos secundarios, estos miotubos multinucleados se cubren de una capa de tejido conectivo que formará la estructura muscular definitiva. A los 35 días de gestación se empiezan a observar los primeros paquetes musculares esqueléticos.

Durante esta fase de crecimiento, comienzan a acumularse proteínas específicas en los miofibrilos, incluyendo α -actina, miosina, troponina, tropomiosina, creatina kinasa, glucógeno, fosforilasas y distrofinas (Mitchel et al., 2001).

En el momento del nacimiento, el número de fibras musculares del animal se ha fijado. Sin embargo, durante el crecimiento postnatal, estas fibras en lugar de aumentar de número aumentan tanto en longitud como en grosor. La hipertrofia muscular está acompañada de un drástico incremento en el contenido de ADN debido a la inclusión de células satélites a las fibras musculares preexistentes. Es interesante remarcar, que a pesar de que el contenido proteico del músculo se modifica a lo largo del crecimiento, la concentración de aminoácidos permanece constante y parece no estar afectado por la dieta (Wünsche, Meinl, Hennig, Kreienbring, & Hd, 1982)

Tejido adiposo

Desde el punto de vista productivo, la grasa es un subproducto muy ineficiente. Para la producción ganadera, el principal gasto económico es la alimentación de los animales, y la cantidad de nutrientes que se destinan a producción de tejido adiposo tiene un índice de conversión mucho peor que los que se destinan a producción de músculo. Debido a los cruces dirigidos para aumentar la producción económica, las razas comerciales se han separado de las líneas locales buscando una reducción de la grasa subcutánea (Barea, Isabel, Nieto, López-Bote, & Aguilera, 2013). Mientras que las razas autóctonas han mantenido su capacidad lipídica y su característico perfil de ácidos grasos (principalmente ácidos grasos monoinsaturados “**MUFA**”) (Ramón Cava, Estévez, Ruiz, & Morcuende, 2003).

Sin embargo, el tejido adiposo es necesario para el animal, tanto para el aislamiento térmico de razas con menos pelo, o como acúmulo de energía metabólica. El tejido graso es una fuente energética muy importante para los cerdos que se crían en extensivo, y también en regiones donde existen épocas de bajas temperaturas o las

instalaciones no pueden garantizar la termoneutralidad. Los ácidos grasos se movilizan del tejido adiposo para servir de combustible de los procesos oxidativos de los tejidos periféricos y del músculo esquelético. (Mitchel et al., 2001).

Está generalmente aceptado que los adipocitos se diferencian de una célula pluripotencial mesenquimatosa. Esta misma línea celular será la encargada de generar los tejidos musculares y esqueléticos y si tiene la señalización celular adecuada, se diferenciará en adipocitos. Esta diferenciación se ha estudiado en fibroblastos de ratones, que si se cultivan en un medio con unas características específicas (insulina, glucocorticoides, hormonas tiroideas, y reactivos que aumentan el AMP cíclico) estas células se diferencian en unos adipocitos evidentes, con gotas de lípidos visibles (Suryawan & Hu, 1995).

La detección de adipocitos claramente diferenciados en fetos porcinos comienza de 50 a 60 días de gestación (Hausman, Wright, Dean, & Richardson, 1993). Estas células se disponen en grupos que aumentan en tamaño y número a medida que la edad del feto aumenta. A mayor tiempo de gestación, se diferencian más adipocitos y cada célula aumenta de tamaño por un aumento en los depósitos de lípidos. Al nacimiento ya existe una fina capa de tejido subcutáneo en la espalda del cerdo. El mayor grosor se encuentra en la mitad de la región dorsal y cerca del cuello. Desde estos puntos existe un gradiente de crecimiento que se extiende caudal y lateral. Al principio los adipocitos son multiloculares, es decir, con múltiples acúmulos de lípidos en forma de gotas. Sin embargo, dos días después del nacimiento, la mayoría ya tiene el aspecto clásico de adipocito unilocular con la gota de lípidos central. Los adipocitos aumentan su tamaño principalmente con la inclusión de triglicéridos, que se acumulan en esa gota central. Aunque este crecimiento es muy rápido en las primeras etapas de la vida del animal, la deposición grasa como porcentaje de peso canal es relativamente pequeño comparado con el crecimiento de masa muscular y de tejido óseo. La deposición grasa aumenta considerablemente en fases más tardías del desarrollo del animal (Mitchel et al., 2001).

El metabolismo lipídico también cambia a lo largo de la vida del animal, los recién nacidos tienen muy poca capacidad de movilizar ácidos grasos de los depósitos de grasa durante momentos de déficit nutricional. En parte se puede explicar por el pequeño tamaño de las gotas de lípidos dentro de los adipocitos, pero también se ha estudiado que ocurre por una baja actividad de lipólisis en estos adipocitos (medido *in vitro*). Por otro lado, los procesos de síntesis de triglicéridos se dan con mucha más frecuencia tras el nacimiento, que es coherente con la rápida hipertrofia de los adipocitos en esta etapa. Los procesos de síntesis *de novo* de ácidos grasos no son muy abundantes hasta el destete, ya que el animal obtiene la mayoría de los ácidos grasos de la leche de la madre. Sin embargo, la acción de la lipoproteína lipasa está muy aumentada en estos animales favoreciendo la lisis de los ácidos grasos y su posterior almacenamiento en el interior del adipocito. La hipertrofia que sufren los adipocitos en esta etapa es debida principalmente por estos procesos de acumulación de lípidos y por las rutas de biosíntesis de triglicéridos. Los procesos de lipólisis y biosíntesis se modifican enormemente a lo largo del desarrollo del animal (Mitchel et al., 2001).

Desarrollo de tejidos grasos y factores no genéticos que intervienen

La grasa corporal en el cerdo se sitúa en diversas localizaciones: subcutánea, peri renal, intermuscular o intramuscular entre otros. Pero de todos estos acúmulos de grasa, el más importante es la grasa subcutánea con un 60-70% del total de toda la grasa del organismo, le sigue la presente en músculo con un 20-35% y por último la peri renal con un 5% (Monziols, Bonneau, Davenel, & Kouba, 2005). La importancia cuantitativa de la grasa subcutánea la ha convertido en objetivo en los procesos de selección. La forma más directa de reducir la grasa total de un individuo es seleccionar animales con una menor grasa subcutánea, y de esa forma se reduce el principal acúmulo lipídico del organismo. Otro de los motivos para elegir la grasa subcutánea a la hora de reducir las reservas de lípidos es que es una capa fácilmente medible y con una alta correlación a la hora de calcular la grasa total de una canal. No todas estas capas tienen la misma importancia a la hora de valorar la calidad de los productos

cárnicos, ya que un exceso de grasa subcutánea siempre se puede retirar a la hora de preparar la pieza para el consumidor. Sin embargo, la grasa acumulada en musculatura (tanto intramuscular como intermuscular) no se puede retirar y supone un mayor impacto en la aceptación por parte de los consumidores (Maryline Kouba & Sellier, 2011).

En el cerdo existen diferencias importantes entre la composición de ácidos grasos de la grasa subcutánea y su espesor, lo que tiene un efecto muy importante en la percepción organoléptica de estos productos. Se ha estudiado que, a mayor espesor de grasa subcutánea, se produce un aumento del porcentaje de MUFA, principalmente el Oleico (C18:1), mientras que los ácidos grasos poliinsaturados “PUFA”, se reducen a mayor espesor de grasa dorsal (Wood *et al.*, 2008a). Los triglicéridos (o lípidos neutros) componen más del 90% del tejido adiposo. En musculatura hay una proporción alta de fosfolípidos, con una mayor concentración de PUFA que actúa como constituyente de membranas celulares (Wood *et al.*, 2008a).

La grasa infiltrada en musculatura, pese a no ser la más abundante del organismo, es de gran importancia a la hora de valorar un producto cárnico, y tiene una proporción de ácidos grasos ω -3 y ω -6 mayor que la grasa de cobertura (Wood *et al.*, 2008b).

Según Kouba and Sellier (2011) existen ciertos factores que afectan a la deposición grasa sin intervenir la genética del animal:

Edad: lo primero que se desarrolla en un animal en sus fases tempranas de crecimiento, es el tejido óseo con un crecimiento relativamente lento y el tejido muscular con un desarrollo bastante más rápido. Cuando se alcanza cierto grado de madurez, comienza a aumentar el tejido graso, mientras que el tejido muscular y óseo ralentizan su deposición (McMeekan, 1940; Wagner *et al.*, 1999). Entre los 7 y 20 kg de peso vivo, la capa lipídica se desarrolla principalmente por hiperplasia de los adipocitos. Más tarde, de 20 a 70kg, se combinan procesos de hiperplasia y de hipertrofia. Y de los 70kg en adelante, el tejido adiposo se desarrolla por procesos de

hipertrofia de los adipocitos, es decir, el incremento de las reservas lipídicas en los animales adultos son principalmente por el aumento de tamaño de los adipocitos (Y. B. Lee & Kauffman, 1974).

Durante mucho tiempo se pensó que el crecimiento de grasa intermuscular es más lento que el de la subcutánea o el de la peri renal. Sin embargo, otros estudios han determinado que su crecimiento es muy similar a la grasa subcutánea, siendo la peri renal la que más crece en función de su tamaño (M. Kouba & Bonneau, 2009). En este mismo estudio, se compararon animales de 30, 70 y 110kg para determinar el contenido lipídico en las distintas localizaciones, y concluyeron que la grasa peri renal es donde más lípidos se depositan, seguido de la subcutánea y por último la intermuscular e intramuscular.

La región anatómica: Existen variaciones en los procesos de lipogénesis según la región anatómica donde se analicen. Por ejemplo, las diferencias en la actividad de la acetil-CoA carboxilasa, la enzima málica (estudiadas en la parte de expresión génica de esta tesis) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fueron mínimas en la grasa subcutánea de la zona del cuello, tuvo la máxima actividad en la grasa subcutánea lumbar y una actividad intermedia en la grasa de la musculatura (Mourot, Kouba, & Peiniau, 1995).

Las diferencias en el tamaño del tejido adiposo están estrechamente relacionadas con el tamaño de los propios adipocitos. Por lo tanto, estos cambios morfológicos siguen el mismo patrón que el ya observado anteriormente con las regiones de más a menos deposición grasa. (Anderson, Kauffman, & Kastenschmidt, 1972). Los adipocitos alcanzan su tamaño máximo en la grasa peri renal, tienen un tamaño intermedio en la subcutáneo y son más pequeños en la inter e intramuscular.

Se conoce desde hace mucho tiempo, que el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en el tejido adiposo sufre un gradiente negativo conforme se va profundizando en el organismo, siendo las capas más superficiales (la subcutánea) las que tiene más porcentaje de ácidos grasos insaturados. Le sigue después la

intermuscular e intramuscular, y por último la peri renal con la menor concentración de insaturados (Dean & Hilditch, 1933; Monziols et al., 2005). Esta diferencia de concentración de ácidos grasos insaturados es debido tanto a monoinsaturados como a poliinsaturados.

El género y la castración: Existe un gran efecto del género en la deposición grasa del cerdo. Desde hace mucho tiempo (Martin, Fredeen, Weiss, & Carson, 1972) se conoce que los verracos tienen una cantidad de tejido adiposo subcutáneo lumbar, peri renal e inter/intramuscular que las hembras. La castración se ha estudiado que produce un gran incremento en la deposición grasa (Henry, 1977). Este aumento del tejido adiposo es principalmente por una hipertrofia de los adipocitos en lugar de un aumento del número de células (Y. B. Lee, Kauffman, & Grummer, 1973).

Efecto del ambiente y la temperatura: Una temperatura de 18 a 21° se considera ideal para un crecimiento y una producción óptima en el cerdo (Maryline Kouba & Sellier, 2011). La temperatura ambiente afecta a la ganancia de masa corporal, modifica la ingesta diaria, la producción de calor, la composición del jamón y las características del tejido adiposo (Lefaucheur et al., 1991). Se ha estudiado que un aumento de la temperatura, conlleva un aumento de la deposición grasa en los acúmulos viscerales, con la consiguiente reducción de la deposición en grasa subcutánea. La grasa intermuscular no se ha visto afectada por la temperatura (Lefaucheur et al., 1991).

Efecto de la nutrición: Se ha observado que animales con una dieta *ad libitum* tienen una distribución del tejido adiposo con preferencia en la deposición peri renal, y con una reducción en la deposición grasa intermuscular (Kempster & Evans, 1979). También se ha estudiado que el porcentaje de proteína en la dieta tiene un efecto en la deposición de grasa intermuscular; a concentraciones más bajas de proteína, se observó un incremento en el porcentaje de grasa intermuscular (Wood et al., 2004). Estos resultados se completan con el trabajo de Tejeda et al. (2020), en el

que confirma que los cerdos Ibéricos acabados con dietas bajas en proteína y los acabados en Montanera tienen un mayor contenido de grasa intramuscular en el músculo *Serratus ventralis* que los alimentados con el cebo convencional.

Efectos de la genética en el desarrollo de los tejidos grasos y musculares

En relación al contenido en grasa y a la composición de ácidos grasos se sabe que está directamente relacionado con la calidad sensorial de los productos curados (Guillevic, Kouba, & Mourot, 2009; Webb & O'Neill, 2008). Hay estudios que han analizado el perfil lipídico de músculos tales como el *Bíceps femoris* o el *Tibialis cranealis* en líneas ibéricas puras y cruzadas con Duroc (Andrés et al., 2001). También se han estudiado los efectos que tiene el tipo de alimentación en el crecimiento, la composición de la canal o en la calidad de los productos cárnicos (Lebret, 2008). Otro estudio ha comparado las diferencias en peso y en la grasa subcutánea de cerdos Ibéricos y la F1 de cerdos Large-White x Landrace, obteniendo que el Ibérico tiene un crecimiento significativamente más rápido y una deposición de grasa subcutánea mayor que la de los cerdos de la F1 (Almeida et al., 2019). En cuanto a la capacidad de ingesta y otros parámetros, Morales et al. (2003) estudiaron las diferencias entre el Ibérico y otras razas como el Landrace, y obtuvieron que el Ibérico tenía una ingesta voluntaria significativamente mayor que los Landrace, así como un aumento significativo de la actividad lipogénica enzimática, más deposición de grasa subcutánea y más contenido de grasa intramuscular.

Son muy pocos los estudios que comparan las características productivas y de calidad de canal y carne de las estirpes más importantes de porcino Ibérico. Según Clemente et al., (2008) los valores para el estadístico de diferenciación genética obtenidos mediante el análisis de las frecuencias alélicas en las subpoblaciones estudiadas de cerdo Ibérico, reflejan en general una alta diferenciación genética entre estas subpoblaciones, lo que implica que existe una incuestionable diversidad

intrarracial en el Cerdo Ibérico. Debido a estas diferencias, se plantea la posibilidad de efectos de heterosis en cruces dentro de la misma raza de las distintas estirpes, y estudios de Ibáñez-Escriche *et al.*, (2014, 2016) corroboran esta hipótesis, sin embargo, en sus estudios no cuentan con la estirpe Lampiña incluida en este proyecto. Estas diferencias son corroboradas también a nivel morfológico (Delgado, Barba, Diéguez, & Cañuelo, 2000). Por otro lado, diversos estudios comparan la composición de canal y carne de diferentes sistemas alimenticios, (D. Ayuso *et al.*, 2014), pero sin tener en cuenta el genotipo ibérico. No obstante, Clemente *et al.*, (2008) constatan que la estirpe Ibérica Negro Lampiño muestra los porcentajes de proteína (23,7%), capacidad de retención de agua (17,1%) e infiltración grasa intramuscular (5,28%) más elevados que los de las otras variedades y cruces estudiados de cerdo Ibérico.

Es importante mencionar, que en explotaciones en las que convivan juntas varias estirpes de Ibérico en extensivo puede existir cierto grado de competencia entre los animales de la explotación, desfavoreciendo a las estirpes o los animales con menor crecimiento. De esta forma, Benito *et al.* (2000) recogieron que la estirpe Torbiscal presentaba un crecimiento mayor a la Retinta en su estudio, que podría estar influenciado por ser la estirpe que entra con más peso a la montanera y tener prioridad a la hora de aprovechar los recursos de la dehesa. En el estudio anterior también se compararon los productos cárnicos entre el Torbiscal y el Retinto y sus cruces, sin encontrar demasiadas diferencias, sin embargo, en la grasa intramuscular sí que se vio una diferencia significativa entre los Retintos (y sus cruces) con mayor infiltración grasa que los Torbiscales (y sus cruces).

Igualmente, Astiz and Alfranca, (1998) resaltaron la capacidad mejorante de los verracos de Negro Lampiño en la calidad de la carne, sobre todo en la grasa infiltrada. Sin embargo, en el estudio realizado por Benito *et al.*, (2000), no hubo diferencias significativas en relación al porcentaje de grasa intramuscular entre los Lampiños y otras variedades, si bien los lampiños tuvieron más grasa de cobertura. Asimismo, la estirpe Lampiña fue la estirpe que presentó los solomillos más pesados (703,65 g), a

pesar de su menor peso de canal (127 kg), contrastando con la Torbiscal, que tuvo los solomillos más ligeros (647,05 g) con la canal más pesada de todas (138 kg), y además mostró el valor de rendimiento de solomillos más pobre (Clemente et al., 2008). Existen estudios en cerdo blanco que valoran el desarrollo y la composición de distintos grupos musculares a lo largo del crecimiento del animal y de esta manera encontrar el peso óptimo de sacrificio para conseguir unos productos de calidad (Latorre, Lázaro, Valencia, Medel, & Mateos, 2004). Para este tipo de estudios, se han desarrollado técnicas ecográficas para un seguimiento no lesivo de ciertos parámetros productivos y así poder valorar crecimientos musculares y espesores de grasa de forma inmediata y reproducible (Izquierdo, 2007).

Utilización del ultrasonido para medir la composición grasa y muscular

Se puede determinar el espesor de la grasa dorsal de forma ecográfica, obteniendo unos resultados de precisión aceptable (Daza, Mateos, Ovejero, Rey, & López Bote, 2005) y de esta manera realizar un seguimiento del engrasamiento del animal a lo largo del tiempo para conocer su estado de maduración o determinar su capacidad de deposición lipídica. Otro parámetro que puede obtenerse de forma ecográfica sin necesidad de esperar hasta el sacrificio es el porcentaje de grasa intramuscular (Newcom, Baas, & Lampe, 2002; Newcom, Baas, Schwab, & Stalder, 2005). Gracias a estas técnicas, Almeida et al. (2019) realizaron un exhaustivo estudio ecográfico en cerdos Ibéricos y la F1 de Large-White x Landrace de las capas de grasa subcutánea en tres etapas del acabado, al inicio, a la mitad y a la finalización, y en tres puntos distintos, a la altura de la 10-11 costilla, 6.5cm más a la derecha que el primer punto y a la altura del glúteo. De esta forma, hallaron que la grasa interna crecía de forma significativamente mayor a las otras capas. También hallaron que el cerdo Ibérico tenía una capa grasa mucho mayor a la F1 de Large-white x Landrace en las tres zonas ecográficas, además de encontrar una correlación de 0,8 entre la grasa dorsal total y la grasa intramuscular. Ayuso et al. (2013) también trabajaron en la predicción

de valores productivos en base a estudios ecográficos. En este caso también se usaron tres localizaciones, una a la altura del 10 espacio intercostal, otra caudal a la última costilla y una última a la altura del glúteo. De estos puntos se tomaron medidas del lomo y de las capas grasas y se obtuvo que la imagen ecográfica del lomo estaba correlacionada en un 0,84%, 0,42% y 0,36% con el peso canal, el peso del jamón y el peso de la paleta respectivamente.

La posición a la que se toman las imágenes ecográficas modifica mucho los valores que se obtienen una vez analizadas las imágenes. De hecho, los trabajos de Fortin (1986) ya dejaban patente que los valores de grasa dorsal modulan a lo largo del animal, siendo su máximo a la altura de la cruz, reduciéndose gradualmente hasta la última costilla, luego aumenta otra vez en a lo largo del lomo pero se vuelve a reducir a la mitad del musculo *Gluteus medius*, y posterior a este músculo aumenta una última vez. Sin embargo, el desarrollo de esta grasa no es homogéneo durante el crecimiento, la grasa total aumenta más lenta en la cruz y más rápida cerca de la última costilla. Por otro lado, la grasa media se desarrolla de forma general más rápida que la interna. Estos cambios en el espesor graso se recogen también en los estudios de Almeida et al. (2019), detectando cambios compatibles con los estudios de Fortin (1986) según se toman medidas a lo largo del animal.

En definitiva, se han realizado diversos estudios de ultrasonidos en cerdo Ibérico, y se ha comprobado que son una herramienta eficaz para poder detectar cambios en tejido adiposo o tejido muscular mediante técnicas no invasivas que aportan suficiente información como para realizar algunas predicciones y para realizar seguimientos de los tejidos durante el crecimiento. Es importante remarcar el papel que juegan las capas de grasa subcutánea a la hora de manifestar los cambios por alimentación y/o genotipo, ya que no se modifican todas de la misma forma, y su presentación cambia según la ventana acústica que se use para las medidas ultrasónicas. Mientras que en los estudios de Almeida et al. (2019) se identifican sólo dos capas de grasa subcutáneas, en este estudio con el protocolo ecográfico que se ha

propuesto se puede identificar una capa bien definida más profunda englobada en la anteriormente llamada capa interna, obteniendo así tres capas subcutáneas: externa, media e interna, como ocurría en los estudios de Fortin (1986).

2.5. Metabolismo Lipídico

Biológicamente, los lípidos son una macro biomolécula soluble en disolventes apolares, cuyas funciones incluyen la acumulación energética, señalización celular o componentes celulares en las membranas lipídicas. Son los ácidos grasos, ceras, esteroides, vitaminas, mono-di-triglicéridos y fosfolípidos. Aunque a veces el término “lípidos” se use como sinónimo de “grasa”, la grasa se refiere específicamente a los triglicéridos incluidos dentro de la familia de los lípidos.

En este estudio nos centraremos principalmente en los lípidos que intervienen en la reserva energética del animal, los triglicéridos, que se acumulan en el tejido adiposo, concretamente en los adipocitos. Los triglicéridos son una gran fuente de energía ya que están formados por estructuras completamente reducidas. El adipocito antiguamente se creía que era simplemente un reservorio de lípidos, sin embargo, se ha comprobado que tienen un papel fundamental en el metabolismo lipídico y en la homeostasis de la glucosa (Rosen & Spiegelman, 2006).

Principales ácidos grasos y su procedencia

Los ácidos grasos son un grupo muy amplio de moléculas formadas por una cadena de hidrocarburos que termina en un grupo carboxilo. Esta disposición molecular confiere a la estructura un extremo polar hidrofílico y un extremo apolar hidrofóbico insoluble. Los ácidos grasos pueden estar saturados o insaturados, y pueden contener a lo largo de la cadena grupos funcionales como oxígenos, halógenos, nitrógenos o sulfuros. Muchas prostaglandinas están formadas por eicosanoides, derivados del ácido araquidónico y el eicopentanoico. Tienen una gran importancia biológica, ya que forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, que son los constituyentes de la bicapa lipídica de las membranas celulares. Los ácidos grasos suelen estar conjugados como triglicéridos, almacenándose en el tejido adiposo.

En 1904, Franz Knoop descubrió la β -Oxidación en un experimento en el que alimentaba perros con ácidos grasos de número de carbonos pares e impares, para posteriormente analizar la orina de estos animales, y encontró que los animales a los que se les había administrado ácidos grasos impares tenían distintos ácidos grasos en orina (ácido hipúrico) que los administrados con ácidos grasos pares (ácido fenacetúrico). Con estos resultados, Knoop concluyó que el metabolismo de ácidos grasos se llevaba a cabo por la sustracción progresiva de dos en dos átomos de carbono. Además, precisó que la reacción de oxidación se realizaba en el carbono β . Más tarde otros autores corroboraron los descubrimientos de Knoop, y al cabo de los años se fue identificando de forma más completa el funcionamiento de estos procesos metabólicos (Houten & Wanders, 2010). En 1948, Albert L. Lehninger descubrió que estos procesos se realizaban en la mitocondria, y esto implicaría que los ácidos grasos deben sufrir varios procesos de transporte antes de poder experimentar las reacciones de oxidación. De este modo surgen los estudios de Irving B. Fritz's en el 1959, en los que se descubre el papel fundamental de las carnitinas en el metabolismo de los ácidos grasos, tanto como protectores del estrés oxidativo como transportadores de ácidos grasos al interior de la mitocondria (Fritz & McEwen, 1959; Houten & Wanders, 2010).

En definitiva, la β Oxidación genera un grupo carbonilo en el carbono β de cualquier ácido graso y lo termina rompiendo, obteniendo un acetil-CoA y un ácido graso con dos carbonos menos. Este proceso se compone de 4 fases, la primera es una oxidación del ácido graso en la que la enzima Acil-CoA deshidrogenasa reduce una molécula FAD a FADH₂ para insaturar el enlace entre el carbono α y el carbono β . La segunda es llevada a cabo por la Enoil-CoA hidratasa, que añade una molécula de agua a la insaturación, colocando un grupo hidroxilo (-OH) en el carbono β . La tercera fase es otra oxidación del ácido graso llevada a cabo por la L-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, reduciendo NAD a NADH y obteniendo un H⁺ adicional, estableciendo un doble enlace entre el carbono β y el oxígeno. Por último, la enzima Tiolasa separa el carbono α del carbono β liberando en el proceso una Acetil CoA. Se puede observar el proceso resumido en la **Figura 8**.

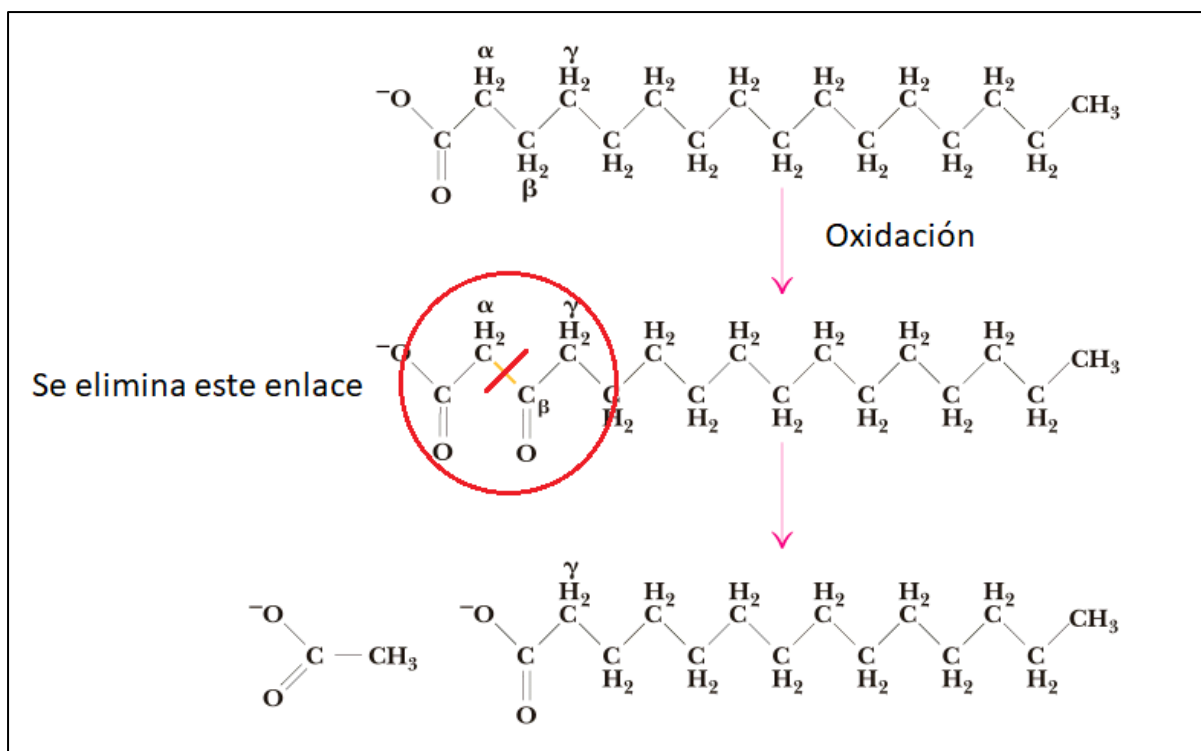


Figura 8. Proceso metabólico de β oxidación resumido, adaptado de (Garrett & Grisham, 2008)

Debido a que las dietas comerciales suelen ser más ricas en carbohidratos que en ácidos grasos, muchos ácidos grasos se sintetizan *de novo*. Estos procesos son mucho más abundantes en animales bien alimentados que en animales con déficit alimentario, debido a que estos procesos se realizan en base a los niveles de glucosa, y se necesitan unos niveles mínimos de glucemia para asegurar el funcionamiento del sistema nervioso central (Salati & Goodridge, 1996). La síntesis *de novo* de ácidos grasos se lleva estudiando desde hace décadas, en un primer momento se aceptaba que todo proceso involucrado en la síntesis de ácidos grasos era una variación de las reacciones de la β -oxidación, sin embargo, aunque los procesos biológicos sean similares, existen muchas diferencias con la β oxidación (Wakil, 1961). Como principales diferencias, las reacciones de las síntesis *de novo* se producen en el citosol, se realizan usando las moléculas NADPH/NADP⁺ y se conjugan con distintos grupos transportadores. La síntesis *de novo* se realiza usando unidades de 2 carbonos procedentes del acetil-CoA, estas moléculas se activan convirtiéndose en malonil-CoA.

Mediante la descarboxilación del malonil-CoA y la capacidad reductora del NADPH se produce la elongación de la cadena. Para este proceso, la etapa limitante es la carboxilación de acetil CoA a malonil-CoA llevada a cabo por la Acetil-CoA Carboxilasa (ACACA). Esta enzima está muy regulada y distintas concentraciones de productos favorecen o inhiben su funcionalidad, el palmitoil-CoA favorece su forma inactiva monomérica y el citrato su forma activa polimérica.

Otra etapa fundamental para la biosíntesis de ácidos grasos es la síntesis de ácido palmítico mediante el complejo enzimático Ácido graso sintasa. Este conjunto de enzimas cataliza 6 reacciones que se repiten hasta obtener el ácido palmítico a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH. En esta etapa tienen un papel importante las enzimas que generan NADPH para estas reacciones de síntesis como la Enzima Mállica (*ME*), que se encarga de producir piruvato a partir de malato, liberando NADPH en el proceso. Una vez obtenido el ácido palmítico, se pueden obtener la mayoría de ácidos grasos a partir de este mediante procesos de desaturación, elongación y β oxidación a excepción de los ácidos grasos esenciales, principalmente ácidos grasos poliinsaturados que tienen que obtenerse estrictamente por la dieta. En los procesos de desaturación de los ácidos grasos interviene la Estearoil-CoA desaturasa (*SCD*) que se compone de varias familias y se encargan de añadir dobles enlaces a las cadenas de ácidos grasos saturados. Según Vessby et al. (2002), la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta vienen en forma de ácido linoleico (C18:2 n6), con una pequeña proporción de los ácidos n3: el ácido linolénico (C18:3 n3), el ácido eicosapentanoico (EPA, C20:5 n3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n3). Los ácidos grasos además pueden metabolizarse por reacciones de desaturación y elongación para obtener otros ácidos de cadenas más largas o más insaturados (**Figura 9**).

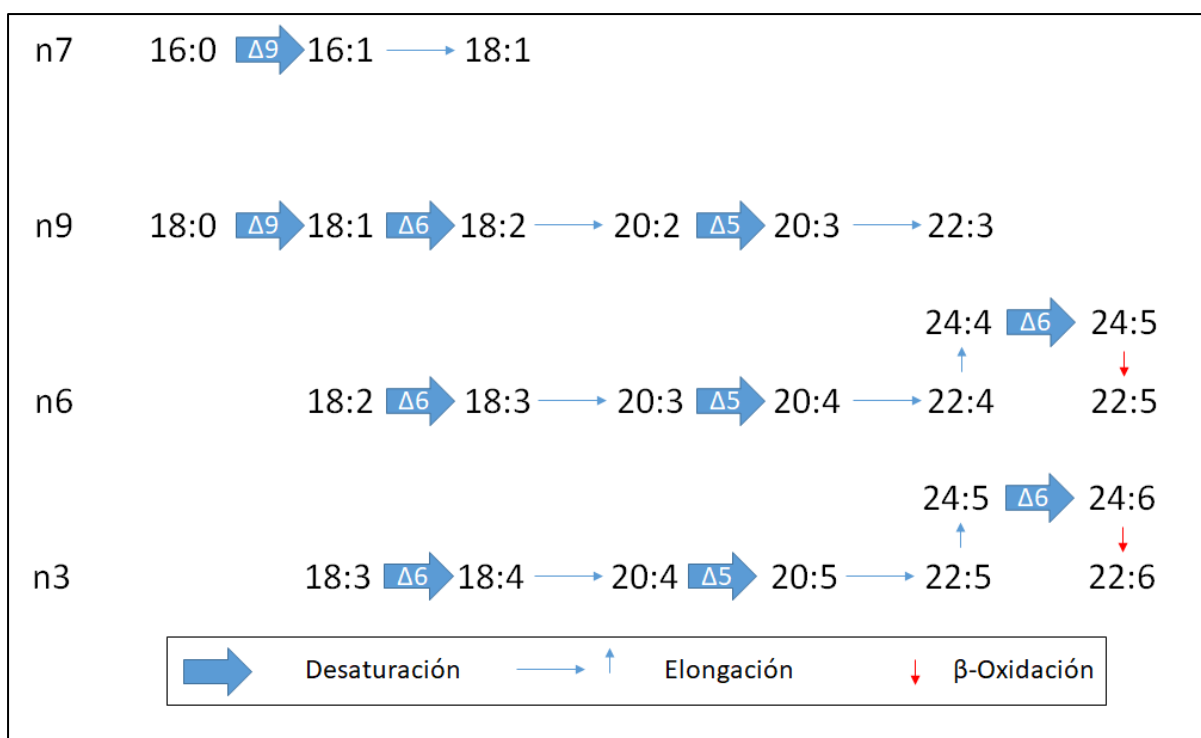


Figura 9. Metabolismo de distintos ácidos grasos, adaptado de Vessby et al. (2002)

Efectos de la dieta y el genotipo en el metabolismo lipídico

Es un hecho que la composición de ácidos grasos acumulados en tejido graso y muscular está condicionada por la composición en ácidos grasos de la dieta (Duran-Montgé, Theil, Lauridsen, & Esteve-Garcia, 2009). En un estudio de Juan Tejeda et al. (2020), se comprobó que cerdos Ibéricos alimentados en extensivo, con dietas bajas en proteínas y dietas control tenían distintos porcentajes de grasa intramuscular. En este estudio los animales alimentados con una dieta en extensivo y con una dieta baja en proteína tenían más grasa intramuscular en el músculo *Serratus ventralis* que los cerdos alimentados con una dieta convencional. También se ha estudiado que la grasa intramuscular del *Biceps femoris* de cerdos ibéricos alimentados en montanera es significativamente mayor que la de animales alimentados con pienso convencional y que la de animales alimentados con piensos suplementados con ácido oleico y tocoferoles (S. Ventanas et al., 2008). Asimismo, se han comparado las diferencias entre el Ibérico y cruce de Large-White en un sistema extensivo y en uno intensivo, en

este caso los animales alimentados en intensivo tuvieron un crecimiento más rápido que los de extensivo, sin embargo hubo pocas diferencias en la deposición de grasa (Almeida et al., 2019). En cerdos Ibéricos y Landrace existe un estudio de Morales et al. (2003) que ofrecen dos dietas distintas a los animales de estudio, ambas similares en el contenido de nutrientes, pero una mayor concentración de almidón y menor de otros polisacáridos. En este estudio se recogió que los animales con la dieta suplementada con almidón tuvieron una deposición de grasa subcutánea significativamente mayor que los de la otra dieta, sin cambios en la grasa intramuscular.

Se ha estudiado que la composición de ácidos grasos del músculo masetero, grasa subcutánea y del hígado presentaron ligeras diferencias en animales con un acabado en montanera y animales acabados con recebo, y diferencias mucho más significativas en el hígado que en el resto de localizaciones estudiadas (Ruiz et al., 1998). En 2002, Lizardo et al., desarrollaron una hipótesis que decía que un 85% de los ácidos grasos absorbidos por la dieta se depositaban tal cual, y la proporción de ácidos grasos sintetizados por síntesis *de novo* permanecía constante durante el crecimiento del animal, sin embargo aunque las predicciones de la composición de ácidos grasos de la grasa subcutánea dorsal y tejido adiposo renal eran aceptables, las predicciones de proteína, contenido lipídico y grosor de la grasa subcutánea no fueron concluyentes.

Existen numerosos estudios que justifican que el genotipo tiene una gran importancia en el metabolismo lipídico. Un gran estudio comparando las razas locales como el cerdo Ibérico con razas modernas más orientadas a producción de músculo (Poklukar et al., 2020) encontró que el tejido adiposo de las razas locales tenía una mayor capacidad para la hipertrofia y la hiperplasia, que podrían explicarse por una mayor síntesis *de novo* en estas razas, además de una mayor movilización lipídica que los diferenciaban de las razas modernas. También se ha investigado acerca de las

posibles mutaciones y SNPs que se pudieran encontrar en las distintas razas de cerdo y su influencia en caracteres de calidad de la canal (María Muñoz, Bozzi, et al., 2018).

Parámetros sanguíneos séricos asociados a la deposición grasa

Dado que tampoco hay muchos estudios que analicen los rangos fisiológicos de los parámetros sanguíneos en cerdos ibéricos, es difícil determinar si los valores obtenidos en este estudio están dentro del rango fisiológico o no. De esta forma, lo que se va a comparar en este trabajo son las diferencias entre estos valores sin valorar su posible carácter patogénico. Recientemente se ha publicado un artículo que compara las diferencias en los parámetros sanguíneos entre el cerdo Alentejano y la F1 de Landrace x Large White (Bressan et al., 2021) obteniendo que los cerdos Alentejanos tenían niveles más altos de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y proteínas totales que los Landrace x Large White. Sin embargo, no existe ninguno que compare estos valores en las distintas estirpes de cerdo Ibérico.

De los posibles parámetros sanguíneos a estudiar, se han elegido la urea, los triglicéridos, el lactato, la glucosa, la fructosa y el colesterol, por su relación con el metabolismo energético, lipídico y proteico.

- La urea es un metabolito resultante del exceso de nitrógeno, que se produce de forma más habitual por un exceso de contenido proteico en la dieta que a un aumento de las reacciones catabólicas que dan lugar al nitrógeno.
- Los niveles de triglicéridos en sangre son un indicador del estado metabólico y nutricional, y acaban depositándose en el tejido graso y muscular.
- Los niveles de colesterol en sangre dependen de la absorción intestinal, la síntesis endógena, el aprovechamiento del mismo en los tejidos, el metabolismo de las lipoproteínas y la excreción biliar. En resumen, dependen de la tasa de ingestión y de la capacidad de absorción, por lo tanto, se puede

concretar está determinada por factores genéticos y dietéticos. El colesterol se puede transportar por torrente sanguíneo en dos tipos de lipoproteínas distintas:

- LDL, el comúnmente conocido como “colesterol malo” que es como se conjuga la mayoría del colesterol en su transporte. Un aumento de este tipo de colesterol está asociado con enfermedad coronaria, y otros riesgos cardiovasculares. El LDL induce aterosclerosis estimulando la infiltración de monocitos y la migración y proliferación de músculo liso. Luego, contribuye a la aterotrombosis induciendo apoptosis en células endoteliales y macrófagos, también estimula la producción de factores tisulares en la musculatura lisa desbalanceando el balance anticoagulante (Mertens & Holvoet, 2001).
- HDL, el “colesterol bueno”, está inversamente relacionado con el riesgo de enfermedad cardiovascular, absorbe el colesterol circulante y lo transporta al hígado. También tiene la capacidad de revertir el estímulo del LDL en la infiltración de monocitos (Mertens & Holvoet, 2001).
- Incluso pequeños cambios en los niveles de fructosamina en sangre pueden ser un indicador o un predictor de la incidencia de la diabetes, así como de complicaciones microvasculares en humanos y cerdos. Ya que un aumento de esta molécula provoca un aumento en la glicación de las proteínas y por consiguiente en la incidencia de ateroma en los vasos sanguíneos (Nichols et al., 2015).
- El lactato se utiliza en el proceso de producción de energía mediante la conversión del glucógeno a piruvato. El lactato aumenta en la sangre en caso de escasez de oxígeno y también es un indicador de estrés.

- La glucosa es la fuente más importante de carbono y energía. El hígado puede liberar glucosa en la sangre o puede depositarse como glucógeno. La glucosa también puede transformarse en ácidos grasos (lipogénesis de novo).

2.6. Principales genes relacionados con el metabolismo lipídico

Descripción de los genes

Existen un gran número de genes relacionados con el metabolismo energético y el metabolismo lipídico, pero para este estudio se han seleccionado estos 7 por su importancia en distintas etapas clave de distintos procesos metabólicos:

El gen *SCD* codifica la enzima esteroil-coenzima A desaturasa (*SCD*), que se utiliza para la síntesis *de novo* de MUFAs a partir de SFAs (Flowers & Ntambi, 2008). Los principales productos (MUFAs) de esta enzima son los ácidos palmitoleico y oleico. Esta enzima se ve alterada por numerosos nutrientes (como ácidos grasos, colesterol, glucosa, fructosa), hormonas y factores ambientales (Flowers & Ntambi, 2008).

La enzima málica (*ME*) es una proteína tetramérica ubicua que cataliza la descarboxilación oxidativa reversible de L-malato a piruvato. Esta reacción, que une la vía glucolítica y el ciclo del ácido cítrico, implica la reducción de NAD(P)⁺ a NAD(P)H (Vidal *et al.*, 2006). En los mamíferos, existen dos isoformas mitocondriales de *ME* (una dependiente de NAD⁺ y otra dependiente de NADP⁺) y una isoforma citosólica (*ME1*; dependiente de NADP⁺), que forma parte de la lanzadera de tricarboxilato, que libera acetil-CoA de la mitocondria al citosol. El NADPH y el acetil-CoA producidos en estas vías se utilizan en la biosíntesis de ácidos grasos y en muchos otros procesos metabólicos (Vidal *et al.*, 2006).

El gen *ACACA* codifica la acetil-CoA carboxilasa α , que cataliza la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA, un regulador de la β -oxidación de ácidos grasos mitocondrial (Stachowiak, Nowacka-Wozzuk, Szydlowski, & Switonski, 2013)

El gen *FASN* codifica la sintasa de ácidos grasos (*FAS*), que regula la síntesis de palmitato a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, y también participa en la síntesis de SFA de cadena larga. Algunos polimorfismos de este gen están asociados a un mayor

grosor de la grasa dorsal en el cerdo (Grzes, Sadkowski, Rzewuska, Szydlowski, & Switonski, 2016).

El gen que codifica la proteína de respuesta temprana-1 (*EGR1*) pertenece a la familia EGR de las proteínas de unión al ADN con dedos de zinc (McCaffrey et al., 2000). El *EGR1* y el *EGR2* regulan el proceso de diferenciación de los adipocitos, siendo el *EGR1* el que tiene un efecto inhibitor. Ambas son necesarias para mantener niveles adecuados de adipogénesis (Boyle et al., 2009). El *EGR1* está altamente expresado en el músculo *Longissimus dorsi* en cerdos con bajo contenido de GIM (María Muñoz, García-Casco, et al., 2018).

El gen *ACOX1* codifica la enzima Acyl-CoA Oxidasa 1, que es una enzima limitante en la vía de la beta-oxidación en los peroxisomas, y su función es catalizar la desaturación de la acil-Coenzima A. *ACOX1* está involucrado en la degradación de las cadenas largas de ácidos grasos. También puede estar relacionado con el grosor y el porcentaje de grasa en (Zuo, Yang, Wang, Lei, & Xiong, 2007).

El gen *ACLY* codifica la enzima ATP-citrato-liasas, que es responsable de la síntesis de acetil-CoA y participa en la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y acetilcolina (Sun et al., 2015).

Estudios de expresión génica: Efectos de la dieta y el genotipo

En cuanto a los estudios de expresión génica, éstos tienen como objetivo valorar la activación de un gen en un tejido mediante la cuantificación del ARN presente. De esta forma se pueden comparar los grados de activación de distintos genes entre distintos individuos. El proceso consiste en extraer el ARN de la muestra y realizar una transcripción inversa (RT) y generar cDNA, que más tarde se amplificará en varios ciclos de PCR cuantitativa (qPCR) junto con los primers de los genes problema y una sustancia con fluorescencia. De esta forma, cuando empiece a existir una cantidad apreciable de producto de la PCR buscado, el fluorocromo se intercalará en las

cadena generadas y la qPCR representará una curva de amplificación, en la que se detectará el valor C_T , un valor adimensional que se considera el ciclo fraccional en la que la señal de fluorescencia supera un umbral definido, y dado que este umbral se localiza en la fase exponencial de la curva de amplificación, el valor C_T es proporcional al logaritmo negativo de la cantidad de copias inicial del transcrito problema (Steibel, Poletto, Coussens, & Rosa, 2009).

Pocos estudios han evaluado la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos en relación con las estirpes de cerdo ibérico en sus diferentes sistemas de acabado. Se ha estudiado que el gen SCD (Stearoil-CoA Desaturasa), responsable de la biosíntesis de MUFA, estaba sobre expresado en cerdos Ibéricos cuando se comparaba con cerdos Duroc puros (Benítez *et al.* 2018) y también cuando se comparaba con el genotipo Duroc x Ibérico F1 (Óvilo *et al.*, 2014). Además, al comparar las estirpes Retinta y Torbiscal y sus cruces dialélicos, los genotipos Retintos presentaron el mayor contenido de PUFA y SFA (Villaplana-Velasco *et al.*, 2021). También existen artículos que comparan los Ibéricos con el Duroc en distintas etapas de crecimiento (Benítez *et al.*, 2018). Por otro lado, también se han estudiado las diferencias de ciertos genes y presencias de SNPs en diferentes razas de cerdo en toda Europa (María Muñoz, Bozzi, *et al.*, 2018). En este completo estudio se puede ver como segregan las diferentes razas de cerdo los alelos con efectos reconocidos en deposición grasa, calidad de carne o resistencia a enfermedades.

2.7. Transcriptómica

Aspectos generales

Los estudios del transcriptoma se engloban dentro de lo que se conoce como Genómica funcional, un campo de la biología molecular que se basa en describir las funciones e interacciones de genes y proteínas haciendo uso de datos del genoma completo en lugar de la orientación clásica de gen a gen (Bunnik & Le Roch, 2013). Este tipo de estudios se han podido realizar gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación de nueva generación (**NGS**), que permiten un genotipado masivo de un individuo en un tiempo que supera con creces a los obtenidos anteriormente con la tecnología de secuenciación *Sanger*. Con estas nuevas herramientas se puede conocer el genoma completo de un ser humano en un día, mientras que con el *Sanger* se tardó una década en completar esa misma tarea (Behjati & Tarpey, 2013).

Las técnicas NGS se están convirtiendo en el método de elección para los estudios de transcriptómica gracias a su gran sensibilidad para detectar nuevos transcritos, a que no necesitan el genoma completo y que eliminan el posible ruido causado por la cuantificación mediante fluorescencia que se utilizaba con las técnicas de *microarray* (Corney, 2013). En este estudio se utilizará la técnica conocida como RNAseq (*RNA sequencing*) que consiste en una técnica de secuenciación que utiliza las herramientas NGS para identificar la presencia y cantidad de RNA en una muestra biológica en un momento específico, lo que se conoce como **Transcriptoma**. De esta técnica se obtienen cientos de millones de “lecturas” de secuencias y la información de miles de millones de bases, pero para poder utilizar esta cantidad tan inmensa de información es necesario recurrir a las técnicas de bioinformática y estadística y así poder interpretar los resultados obtenidos (Chu & Corey, 2012).

El protocolo de las técnicas de RNAseq es bastante similar entre experimentos: en primer lugar, hay que elegir el proceso de NGS que se quiere utilizar, ya que la

preparación de librerías es diferente según la técnica. En este estudio se usará el protocolo de *Illumina* (San Diego, CA, EE.UU.), para ello es necesario aislar el ARN de una muestra, que, según el tamaño y calidad de las muestras, es probable que tenga que pasar por una fase de fragmentación y depuración antes de realizar la conversión a cDNA necesaria para la formación de librerías. Estas librerías se preparan mediante la incorporación de marcadores a los extremos del cDNA así como de *barcodes* para poder identificar el material genético de cada individuo (Corney, 2013).

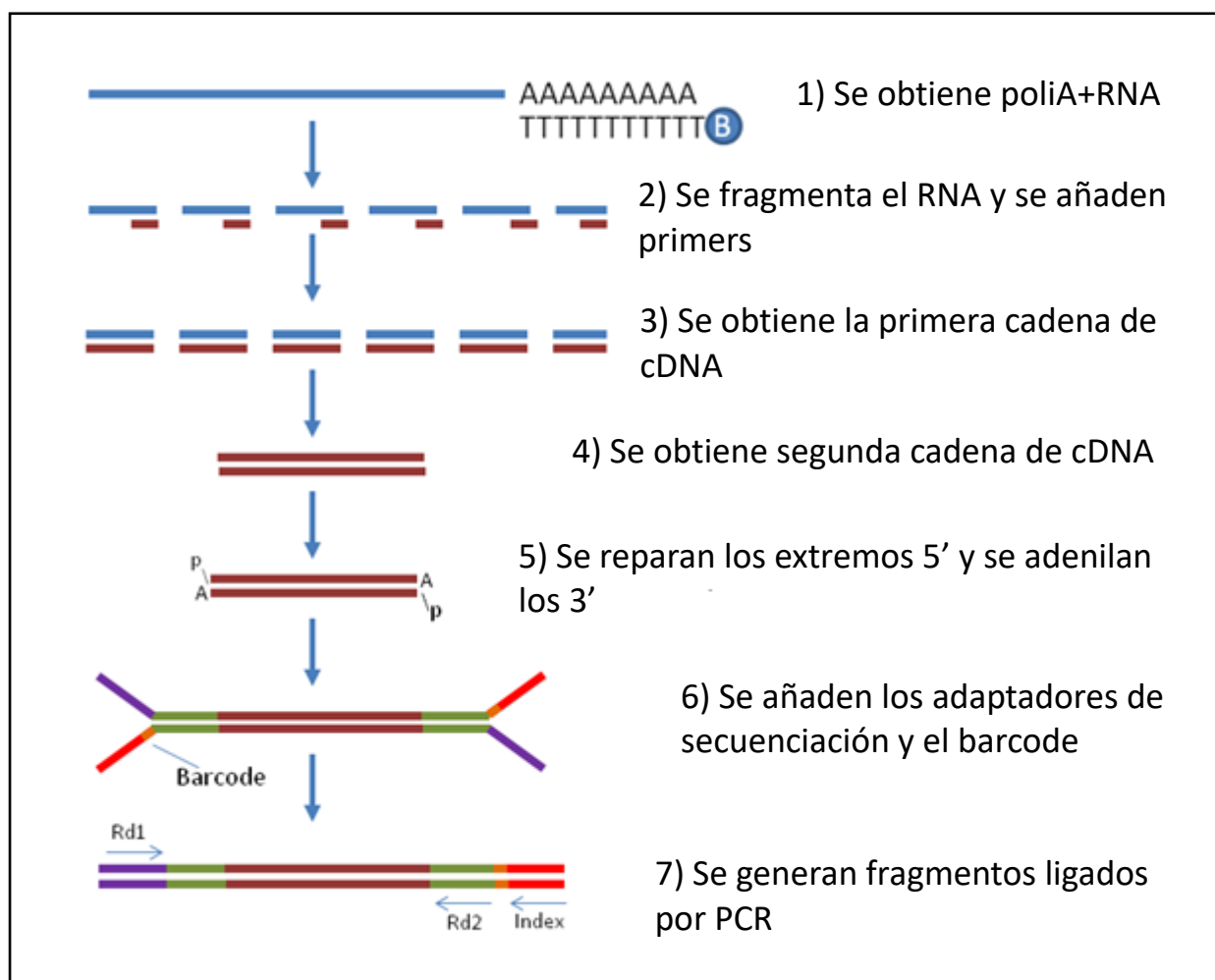


Figura 10. Metodología de preparación de librerías para técnicas de RNAseq mediante NGS. Adaptado de (Corney, 2013).

Una vez preparadas las muestras, éstas se unen todas a una superficie sólida gracias a su adaptador y se realiza la secuenciación simultánea de todos los fragmentos

mediante cámaras fotosensibles muy precisas y nucleótidos marcados. De este proceso se obtiene la base de datos de “lecturas” que tendrá que depurarse con procesos bioestadísticos antes de poder utilizarse. En este estudio se utilizaron los programas FAST QC para valorar la calidad, TRIMGALORE para eliminar adaptadores y hacer selección según tamaño de lecturas, HITSAT2 para mapear las lecturas enfrentando los resultados al genoma de referencia y por último el HTSEQ COUNT, que realiza el conteo de las lecturas para poder realizar análisis estadísticos.

Estudios de transcriptómica en el cerdo Ibérico

En los últimos años, gracias al avance de las NGS, se han realizado varios estudios en el cerdo ibérico usando el RNAseq. Se ha trabajado en las diferencias de *Longissimus dorsi* entre los cerdos de Ibéricos puros y sus cruces con Duroc (M. Ayuso et al., 2016b; Óvilo et al., 2014). En primer lugar se determinó que existían diferencias en el perfil lipídico de los lechones de estas dos variedades, pero esos resultados se contrastaron con la identificación de genes candidatos diferencialmente expresados relacionados con el crecimiento muscular en los animales cruzados y genes relacionados con el metabolismo lipídico y la proteólisis en el Ibérico (Óvilo et al., 2014). Los trabajos de M. Ayuso et al. (2016) continuaron identificando diferencias en el transcriptoma del músculo *Longissimus dorsi* de cerdos Ibéricos y cruces de Ibérico y Duroc pero en este caso se compararon en distintas fases de crecimiento, confirmando que los animales recién nacidos presentaban una fase de crecimiento altamente proliferativa a nivel de transcriptoma, mientras que los animales mayores tenían altamente regulados procesos catabólicos y de funcionamiento muscular. En cuanto a las diferencias entre genotipos, los animales de raza Ibérica pura mostraron más actividad del metabolismo lipídico y de la glucosa, mientras que los cruzados tuvieron una mayor regulación de las rutas relacionadas con el crecimiento muscular al nacimiento, que coincide con el mayor peso de nacimiento de estos animales (M. Ayuso et al., 2016b).

También se estudiaron las diferencias en el transcriptoma de tejido adiposo entre cerdos Ibéricos y Duroc puros acabados con distintas dietas (Benítez et al., 2019), unos alimentados con suplemento de ácido oleico y otros con una dieta estándar de carbohidratos, identificando funciones enriquecidas relacionadas con el crecimiento y desarrollo de tejidos y con el metabolismo de lípidos y carbohidratos entre las dos razas de animales, además de encontrar efectos en rutas biológicas importantes debido a la alimentación. En base a este y los otros estudios se puede determinar que existen diferencias a nivel de transcriptoma entre los cerdos Ibéricos y los Duroc o sus cruces.

Entre diferentes estirpes de cerdo Ibérico también se han estudiado las variaciones en el transcriptoma del *Longissimus dorsi* sobretodo en búsqueda de factores reguladores de la grasa intramuscular (María Muñoz, García-Casco, et al., 2018; Villaplana-Velasco et al., 2021). En este caso se encontró que las estirpes con más grasa intramuscular, también eran las que tenían más expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (María Muñoz, García-Casco, et al., 2018) y que en el caso de la comparación de Retinto y Torbiscal de los estudios de Villaplana-Velasco et al. (2021), la estirpe Retinta, que tenía más contenido graso, era también la que tenía una mayor expresión de los genes relacionados con rutas de transporte, absorción, diferenciación y acumulación de ácidos grasos. En los estudios de Poklukar et al. (2020), se realizó una comparación de las razas de cerdo locales con un formato más graso (incluyendo al cerdo Ibérico) y las razas modernas con un formato más de tipo magro. Analizando el transcriptoma del tejido graso de estas razas se observó que las razas locales tienen una mayor regulación de las rutas relacionadas con la lipogénesis, desaturación, respuesta inmune y transporte de ácidos grasos, mientras que las razas modernas tenían un aumento de la regulación de genes relacionados con el desarrollo de matriz extracelular y metabolismo energético mitocondrial. Estos resultados son compatibles con los revisados anteriormente por los otros autores, en los que se muestra al cerdo Ibérico como un cerdo de mayor actividad de genes relacionados con el metabolismo graso.

3. Metodología

La presente Tesis Doctoral consta de dos experimentos. El **Experimento 1** se llevó a cabo con 65 cerdos Ibéricos puros pertenecientes a tres estirpes (Retinto “R”, Lampiño “L” y Torbiscal “T”) acabados en dos sistemas: cebo de campo y montanera. El **Experimento 2** se realizó con 18 cerdos de los citados tres genotipos, pero alimentados exclusivamente en un sistema de cebo de campo. Con los datos del Experimento 1 se llevaron a cabo 2 estudios: 1) composición corporal, deposición grasa y parámetros sanguíneos y 2) expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Con los datos del Experimento 2 se llevó a cabo un estudio del transcriptoma de muestras del músculo *Longissimus dorsi*.

3.1. Experimento 1: Cambios en los tejidos graso, muscular y sanguíneo en la fase de acabado y expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico

Animales y manejo

Para este experimento, todo el manejo animal se hizo conforme al real decreto sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (RD53/2013), que contempla la directiva europea 2010/63/EU sobre la protección de los animales usados en experimentación. Además, los protocolos de investigación fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Extremadura.

Para este estudio, se utilizaron sesenta y cinco machos castrados de cerdo Ibérico de tres estirpes diferentes (20 de Lampiño, 23 de Torbiscal y 22 de Retinto). Los animales nacieron en la misma paridera y permanecieron juntos hasta que alcanzaron un peso de 99,6, 108,8 y 103,7 kg, a la edad de 417 días (13,9 meses), 394 días (13,1 meses) y 416 días (13,9 meses), para Lampiño, Torbiscal y Retinto, respectivamente. En ese momento se distribuyeron en 2 grupos: 31 cerdos fueron

acabados *ad libitum* con una dieta estándar y equilibrada a base de pienso, en un sistema de cebo de campo (**CC**), y 34 cerdos fueron acabados en montanera con una dieta basada en bellotas y pasto (**CM**), lo que proporciona un alto contenido en ácido oleico y antioxidantes (Tejerina et al., 2012). Ambos sistemas se encuadran dentro de la Norma de Calidad del Cerdo Ibérico (RD 4/2014 del 10/11 de enero de 2014). Tras finalizar el cebo, los animales se sacrificaron con un peso de 155, 164 y 169 kg para Lampiños, Retintos y Torbiscuales, respectivamente. La composición del pienso utilizado para todos los animales durante la fase de crecimiento, y la de cebo para el grupo de cebo de campo, se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición química de la dieta

Parámetro	Valor
Materia seca	12.116 %
Cenizas	5.046 %
Proteína bruta	15.734 %
Grasa bruta	2.628 %
Fibra bruta	4.920 %
Fibra detergente neutra	14.680 %
Energía metabolizable (Cerdo)	3 053,321 kcal/kg
Energía neta (Cerdo)	2 246,490 kcal/kg
Lisina	0.868 %
Metionina	0.260 %
Calcio	0.868 %
Fósforo	0.571 %
Sodio	0.185 %
E4.Cobre	24.840 mg/kg
E1.Hierro	156.833 mg/kg
E5.Manganeso	68.324 mg/kg
E6. Zinc	154.520mg/kg
E2. Yoduro de potasio	0.402 mg/kg
E8. Selenio	0.308 mg/kg
Vitamina A	5 000.000 UI/kg
Vitamina D3	1 000.000 UI/kg
Vitamina E	31.946 mg/kg
Beta-glucanasa	250.000 Gluc/kg
Beta-xilanasa	560.000 Xyl/kg
E321. Hidrotolueno butilado (BHT)	0.144 mg/kg
E320. Hidroxianisol butilado (BHA)	0.024 mg/kg
E324.Etoxiquina	0.053 mg/kg
E562.Sepiolita	0.123 %

Medidas ecográficas de deposición grasa y muscular

Los animales se ecografiaron al inicio y al final de la fase de acabado. El estudio ultrasónico *in vivo* en tiempo real se realizó con un ecógrafo ALOKA (modelo 500SSD, ALOKA Inc., Tokyo, Japan), provisto de una sonda lineal de 3 MHz y 12 cm de longitud. Las imágenes ecográficas se digitalizaron y las mediciones se llevaron a cabo mediante el software *Biosoft Toolbox* de Biotronics Inc. (Iowa) y el software Image-J (USA, NIH). En las imágenes ecográficas se midieron diferentes parámetros indicadores de deposición grasa como son, el espesor de la grasa subcutánea sobre el glúteo (**GGLU**), el espesor de la grasa subcutánea que cubre el músculo semitendinoso (**GST**) y el espesor total de la grasa dorsal (**GDT**) al nivel de la 10ª costilla, y dentro de esta grasa subcutánea dorsal se midió el espesor de cada una de sus tres capas: la grasa dorsal interna (**GDI**), la media (**GDM**) y la externa (**GDE**). También se llevaron a cabo mediciones de espesor o contorno muscular, como el espesor glúteo (**EGLU**), el área del músculo semitendinoso (**AST**) y el área y el espesor de la chuleta (**ACH** y **ECH**, respectivamente) correspondiente al *Longissimus dorsi* al nivel de la 10ª costilla. Cada una de estas medidas se ha denominado aquí con la terminación siguiente: **i** (al inicio de la fase de acabado), **f** (al final de la fase de acabado, previamente al sacrificio), y **d** (diferencia entre la medida final e inicial). A continuación se detalla la obtención de las imágenes ecográficas y las medidas correspondientes.

a) Metodología para las mediciones ecográficas en la zona del lomo

Para poder realizar mediciones precisas y consistentes al nivel de lomo, se estandarizó el proceso de toma de imágenes mediante el siguiente protocolo (D. Ayuso et al., 2013; Newcom et al., 2002). Brevemente, en primer lugar, es necesario realizar una ecografía longitudinal, colocando la sonda paralela a la columna vertebral (a unos 6.5cm de las apófisis espinosas (Almeida et al., 2019) y caudal a la escápula (aproximadamente un ancho de escápula de distancia). Tras ajustar ligeramente la

distancia (mayor o menor) a la columna vertebral hasta que aparezca en pantalla la máxima profundidad (espesor) del lomo o músculo *Longissimus dorsi* (más concretamente, *L. thoracis*), se puede observar su imagen longitudinal con la terminación caudal (“lengüeta”) del músculo trapecio a ese nivel (**Figura 11**). Justo donde termina esta lengüeta se encuentra, más ventralmente en la imagen ecográfica, por debajo de la capa interna de grasa subcutánea dorsal y del lomo, el 10º espacio intercostal (entre la 10ª y 11ª costillas). Después se desliza la sonda craneal o caudalmente hasta dejar aproximadamente 2cm de la lengüeta visible en la pantalla y se marca la posición del borde delantero de la sonda con una barrita de cera de color sobre la piel del animal. Luego se retira la sonda para acoplarle un adaptador anecoico (de un material denominado *Superflab* — *Radiation Products Design Inc.*, Albertville, Minnesota —, o de silicona flexible en su defecto) para ajustarse al contorno torácico para la ecografía transversal del lomo. Una vez colocado el adaptador, se sitúa la sonda de forma transversal según la referencia anteriormente pintada, se desplaza la sonda aproximadamente 2 cm caudalmente (desapareciendo entonces la lengüeta del trapecio) y se inclina con un ángulo de $\sim 30^\circ$ descendente caudalmente (**Figura 12**) para seguir la inclinación del 10º espacio intercostal sin costillas interpuestas.

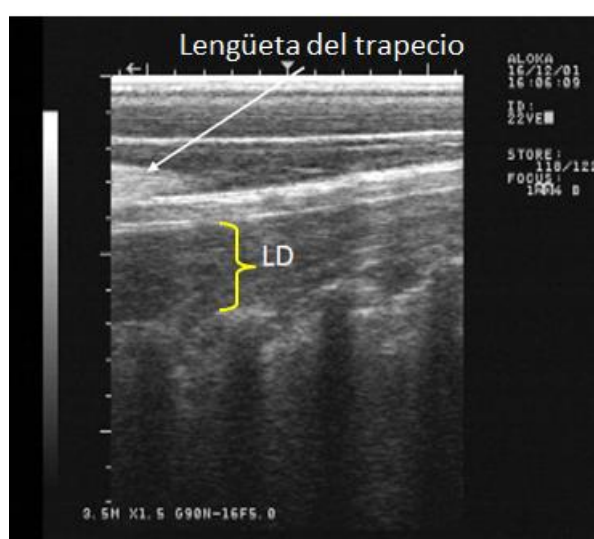


Figura 11. Imagen ecográfica longitudinal del LD (*Longissimus dorsi*) en la que aparece la lengüeta del trapecio



Figura 12. Posición para la ecografía transversal del lomo y de las capas de grasa subcutánea dorsal. La marca anaranjada sirve de referencia para hallar la lengüeta del trapecio.

En la imagen correcta transversal (**Figura 13**) ya no se observa la lengüeta del trapecio, y se observa el área del LD (lomo, chuleta) con una depresión central en el borde superior (en el cerdo Ibérico), y por encima se sitúan, en este orden, las capas de grasa dorsal interna, media y externa y por último la piel. La colocación de la sonda justo sobre el espacio intercostal se comprueba al observar las fascias superior e inferior del músculo intercostal visibles (hiperecoicas) ventrolateralmente con respecto a la sección transversal del lomo.

La grasa dorsal total subcutánea se obtiene sumando las tres capas anteriores. En esta misma imagen ecográfica también se puede medir el área y espesor del lomo (área de la chuleta; espesor de la chuleta; **Figura 14**).

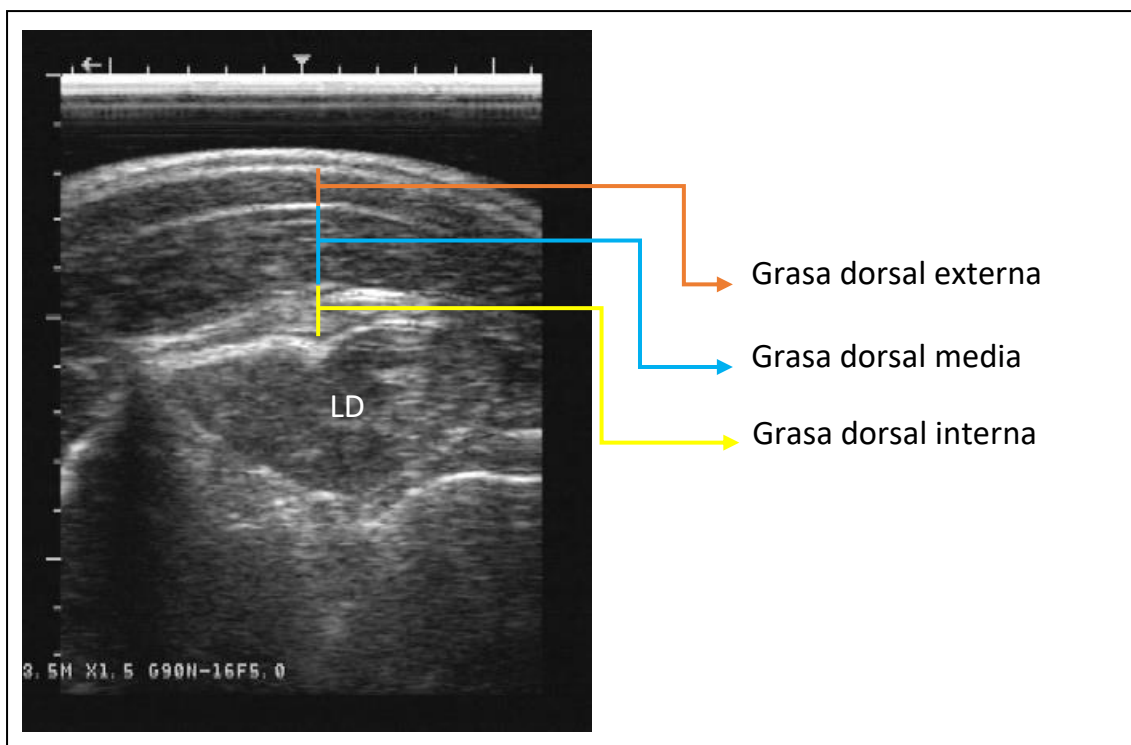


Figura 13. Imagen correcta del lomo (chuleta) en la que aparecen las indicaciones de medidas de las tres capas subcutáneas de grasa dorsal, la interna (GDI) la media (GDM) y la externa (GDE). LD: músculo Longissimus dorsi.

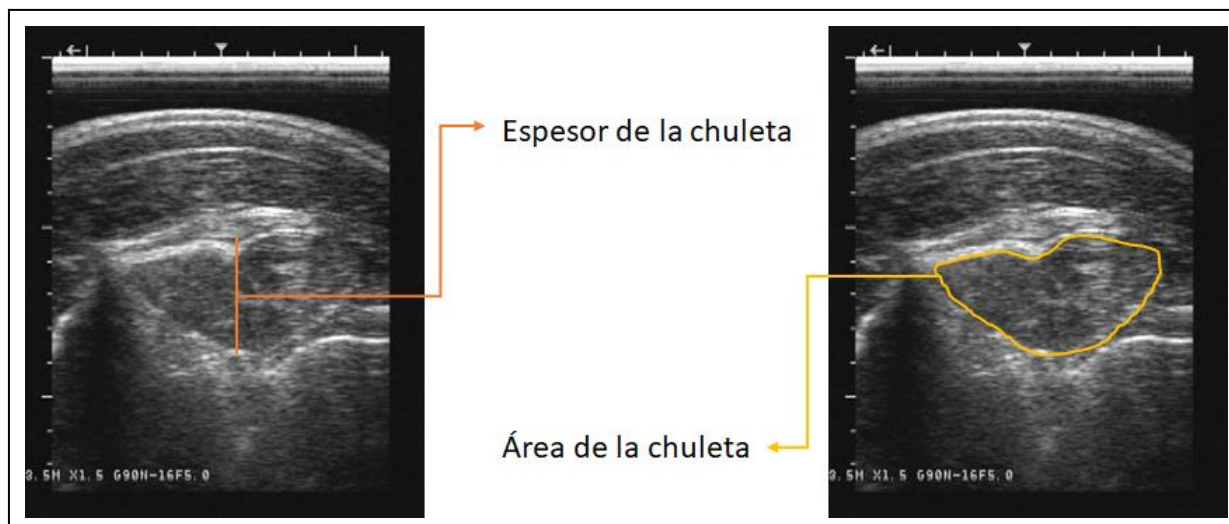


Figura 14. Imagen ecográfica con las medidas de espesor de la chuleta (ECH) y del área de la chuleta (ACH)

b) Metodología de las mediciones ecográficas en la zona glútea

Para tomar medidas ecográficas de la zona glútea, tan fundamental en el cerdo Ibérico debido a la producción de jamón, se ha desarrollado un protocolo para poder medir de forma consistente esa zona. Para ello se coloca la sonda con sus caras laterales perpendiculares a la piel (en esta zona estaría inclinada $\sim 45^\circ$ respecto al plano horizontal) sobre una línea imaginaria que une la punta del anca (centro de la cresta del ala del ilion) y la tuberosidad isquiática, situándola equidistante entre ambas (**Figura 15**). Después se desliza la sonda hacia delante o atrás para situar el promontorio de la espina isquiática (prominencia sobre el acetábulo; más plana en adultos) bajo la vertical de la marca central de la pantalla. Luego se ajusta la sonda con leves giros con respecto a su eje longitudinal hasta lograr una imagen como la que se muestra en la **Figura 16**, modificando la inclinación a uno y otro lado con respecto a la piel hasta que la espina isquiática (situada en el centro) se perciba en la ecografía con una altura mínima. Esta es la imagen de referencia para medir el espesor del músculo glúteo y el espesor de la grasa subcutánea glútea, de forma que se mide en vertical en el centro de la imagen, desde la base imaginaria del promontorio que forma la espina isquiática, hacia arriba (atravesando aproximadamente el centro de la diagonal que separa los músculos glúteos medio y profundo) hasta contactar con la grasa subcutánea glútea, y luego desde este punto hasta la piel bajo la marca central de la pantalla (**Figura 16**). En esta figura también se pueden visualizar parte de los músculos glúteo medio (GM) y glúteo profundo (GP), bien separados por la diagonal que forma una fascia membranosa hiperecoica. En la parte inferior de la imagen también se observa una elevación que indica la presencia de la espina isquiática, un promontorio situado dorsalmente al acetábulo (que es la concavidad de la pelvis donde rota la cabeza del fémur).

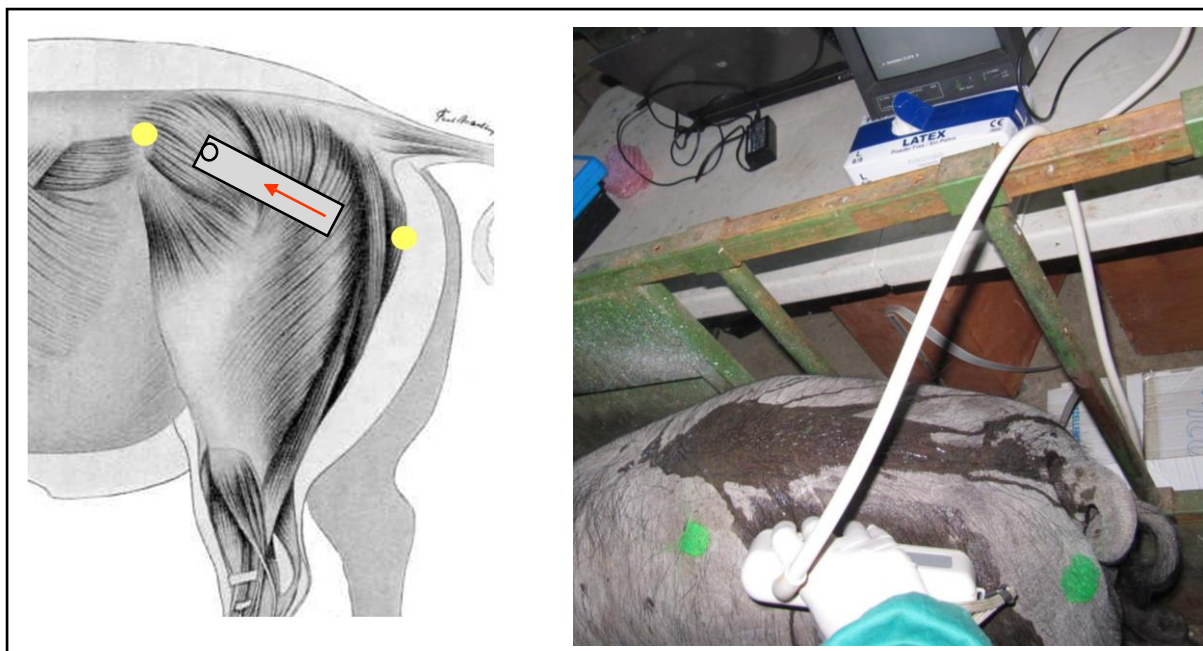


Figura 15. Posición de la sonda en la ecografía glútea. Los 2 puntos amarillos marcan la punta del ilion (punta del anca, delante) y la punta del isquion (tubérculo isquiático, atrás). La flecha en el transductor de la sonda indica la parte delantera de la sonda y la dirección craneal en la pantalla del ecógrafo. Imagen de dibujo anatómico modificada de Sisson and Grossman (1995)

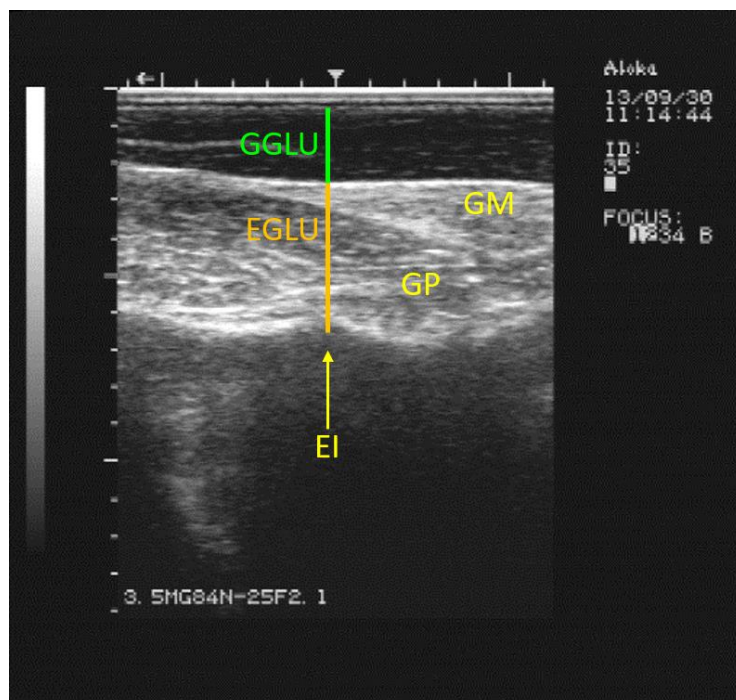


Figura 16. Ecografía glútea. Medición del espesor de la grasa subcutánea glútea (GGLU) y del espesor o profundidad muscular glútea (EGLU). GM: Glúteo medio. GP: Glúteo profundo. EI: Espina isquiática, promontorio óseo sobre el acetábulo.

c) Metodología de las mediciones en la zona del músculo semitendinoso

Otra medida ecográfica desarrollada es la del músculo semitendinoso, con la finalidad de disponer de mediciones de secciones musculares completas en el miembro posterior, también debido a la importancia comercial del jamón Ibérico. De este modo se puede calcular el área de este músculo, así como el espesor de la grasa subcutánea desde el punto donde confluye el músculo semitendinoso con el músculo semimembranoso hasta la piel, pues es la zona donde menos influía la pericia del operario. Para obtener imágenes aptas para realizar mediciones consistentes se sigue el siguiente protocolo: Se coloca la sonda ecográfica (con el adaptador de Superflab incorporado) a aproximadamente un ancho de sonda (4 cm) más abajo de la punta del isquion, en una hendidura justo debajo de un cúmulo de grasa que se nota más fácilmente en los cerdos en buena condición corporal ("hueco subisquiático"). La sonda debe inclinarse longitudinalmente en ángulo descendente de unos 20°, apoyando la punta delantera del adaptador a mitad del periné (en el macho) o en la punta inferior de la vulva (en la hembra), pero el plano de la superficie de contacto entre sonda y piel debe permanecer (al principio) vertical, es decir, el barrido de la sonda no debe apuntar hacia arriba ni hacia abajo (**Figura 17**).

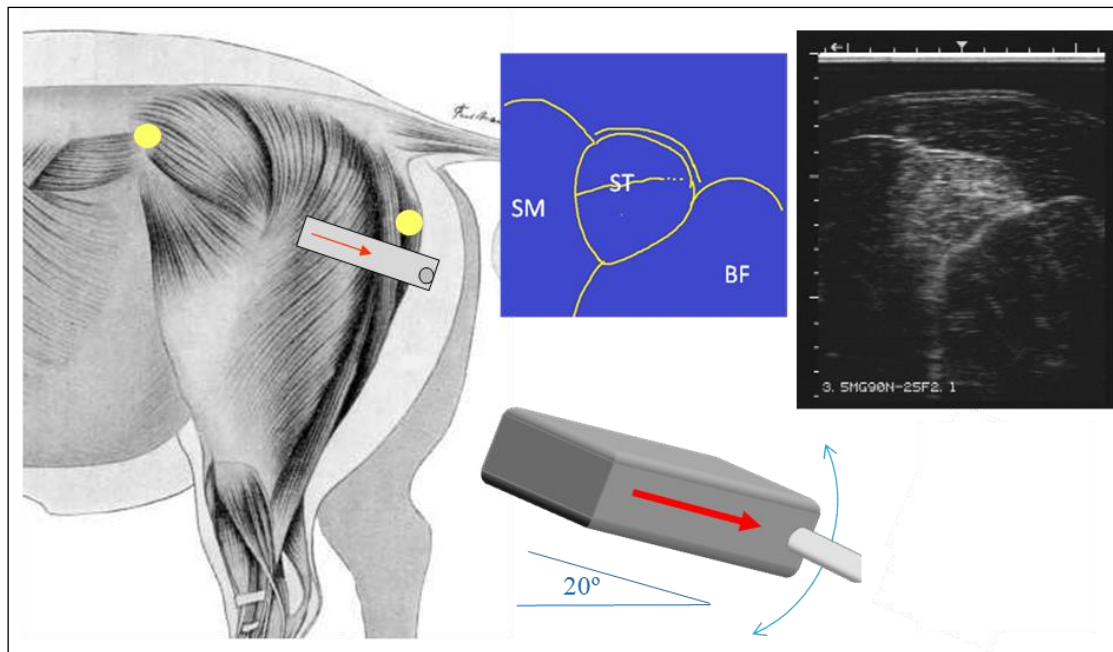


Figura 17. Metodología de la imagen ecográfica del músculo semitendinoso. SM: músculo semimembranoso; ST: músculo semitendinoso; BF: músculo bíceps femoral. La flecha roja en la sonda indica su polo anterior y la dirección craneal en la pantalla del ecógrafo. Los 2 puntos amarillos marcan la punta del ilion y del isquion. Imagen de dibujo anatómico modificada de Sisson and Grossman (1995)

Para obtener una mejor imagen suele ser necesario apretar y hacer pequeños ajustes variando la inclinación del plano de contacto transversalmente (manteniendo los 20° de inclinación longitudinal) hasta obtener una imagen clara próxima a un “triángulo” de lados curvos, de forma que el lado medial limita con el músculo semimembranoso, el lado lateral con el bíceps femoral y el lado caudal con la grasa subcutánea. En ocasiones puede verse una línea hiperecoica (blanca) diagonal en el interior del músculo semitendinoso y una fascia hiperecoica externamente e hipoecoica (negra) internamente el borde que limita con la capa de grasa. En la **Figura 18** se representa cómo se realizan las medidas de espesor de la grasa que cubre el semitendinoso y del área del músculo semitendinoso.

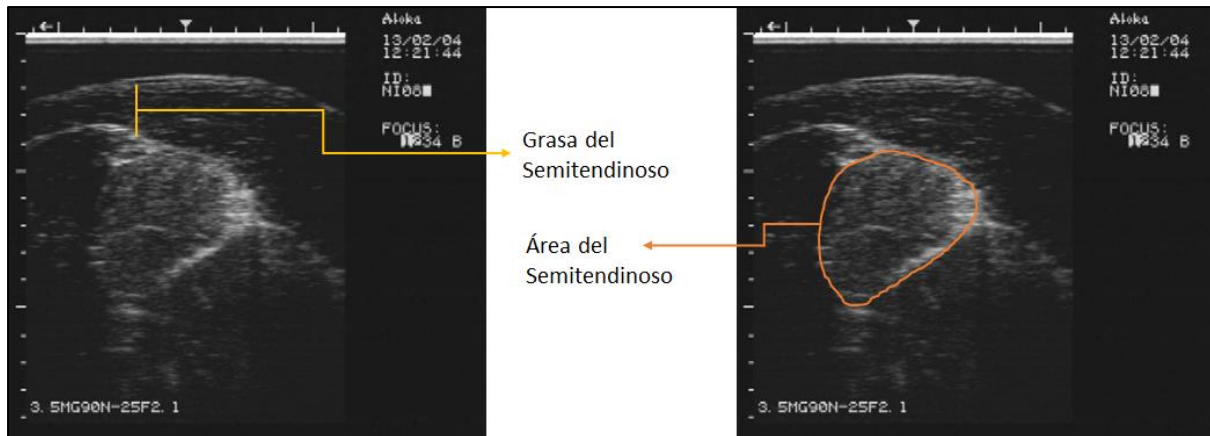


Figura 18. Imágenes ecográficas del músculo semitendinoso en las que se aprecia el “triángulo” de lados curvos, la medición (arriba) de la grasa sobre el semitendinoso (GST) y el área del semitendinoso (AST)

Análisis de plasma sanguíneo

En los mismos días en los que se realizaron las ecografías anteriormente descritas y estando los animales en ayuno se extrajeron 10 ml de sangre de cada animal utilizando el seno orbital como técnica de sangrado (Dove & Alworth, 2015), recogiendo por tanto muestras al inicio y al final de la fase de acabado. Las muestras de sangre se centrifugaron a 21°C a 1500 g durante 10 minutos y, a continuación, se pipeteó el suero sobrenadante y se congeló a -20°C. En las muestras de suero sanguíneo se determinaron, mediante el analizador Saturno 300 Plus (Crony Instruments), los niveles de urea, triglicéridos, fructosamina, colesterol, lactato y glucosa (todos en mg/dl), correspondientes al principio y al final del periodo de acabado, y también se calcularon las diferencias entre estos puntos temporales

Recogida de muestras y datos en el matadero y la sala de despiece

Tras el sacrificio, en el matadero se recogieron inmediatamente muestras de lomo y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para su traslado al

laboratorio, donde se conservaron en un congelador a -80°C para los análisis posteriores de expresión génica. En la sala de despiece se registraron los pesos y longitudes de las canales, así como los pesos de las piezas nobles (jamón, paleta y lomo). Con estos pesos se calcularon los rendimientos del jamón (**RJ**), de la paleta (**RP**), del lomo (**RL**) y el de las piezas nobles en conjunto (**RPN**). También se recogieron y congelaron muestras de lomo a la altura de la décima costilla para determinar el porcentaje de grasa intramuscular (**GIM**), así como muestras de grasa subcutánea de la zona lumbar para analizar su perfil de ácidos grasos.

Calidad de carne

Para calcular el porcentaje de la GIM, se extrajo la grasa de la carne utilizando cloroformo:metanol según la metodología de Folch, Lees, and Sloane (1957). La composición de ácidos grasos se calculó aumentando la polaridad de las columnas de aminopropilo para separar las diferentes fracciones lipídicas según la metodología de García-Regueiro, Rius, and Díaz (1995). La cuantificación de los ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases según la metodología de Cava et al. (1997).

Para los cálculos del índice aterogénico y del índice trombogénico se usó las fórmulas adaptadas de Ulbricht y Southgate (1991).

Índice aterogénico (IA):

$$\frac{[(C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0)]}{\Sigma MUFA + \Sigma n6 + \Sigma n3}$$

Índice trombogénico (IT):

$$\frac{(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{[(0.5 \times \Sigma MUFA) + (0.5 \times \Sigma n6) + (3 \times \Sigma n3) + (\Sigma n3 \div \Sigma n6)]}$$

Ratio n6/n3: $\Sigma \omega 6 \div \Sigma \omega 3$

Extracción de ARN

La extracción del ARN de las muestras de lomo se realizó utilizando el kit de la marca Ribopure. Según indica el protocolo del kit, se seleccionó una pequeña porción de muestra (90-100mg) y se introdujo en un tubo de 2ml con 1m del Reactivo Tri incluido en el kit. Posteriormente se disolvió la muestra con la ayuda de un homogeneizador Polytron. Una vez disueltas, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se almacenaron a -80°C . Tras el almacenamiento en congelación, se añadieron 200 μl de cloroformo a la muestra, se agitó la mezcla en vórtex (15'') y se dejó (5') a temperatura ambiente. Luego se centrifugó (15'; 12.000 g; 4°C) y se obtuvo una mezcla bifásica. La fase acuosa superior, incolora, contenía el ARN, y la fase orgánica inferior, rojiza, incluía el ADN y las proteínas. A continuación, se transfirieron 500 μl de la fase acuosa a un tubo de 1,5 ml (libre de ARNasa). A continuación, se añadieron 250 μl de etanol puro al 100% y la mezcla se agitó inmediatamente durante 5 segundos para evitar la precipitación del ARN. A continuación, se vertió la solución en un tubo con filtro (cartucho filtrante), libre de ARNasa, y se centrifugó (30''; temperatura ambiente; 12.000 g). Después se desechó el líquido (preservando el filtro) y se introdujeron 500 μl de *Solución de Lavado* (incluida en el kit) en dicho cartucho filtrante. Luego el cartucho se centrifugó (30''; temperatura ambiente; 12.000 g), se descartó la "*fracción de flujo*" y a continuación se añadió otra alícuota de 500 μl de la Solución de Lavado. El tubo así vaciado, con el cartucho filtrante dentro (que contiene el ARN) se centrifugó de nuevo durante 30 segundos a temperatura ambiente y 12000 g para descartar los residuos de la solución de lavado. A continuación, el filtro del cartucho se transportó a un nuevo tubo libre de ARNasa. Después se añadieron 100 μl de *Tampón de Elución* (incluido en el kit) al cartucho de filtrado. Tras incubarlo a temperatura ambiente durante 2 minutos, se centrifugó durante 1 minuto a temperatura ambiente y 12000g. El resultado fue una dilución con dos fases, con el ARN en el buffer en la fase superior (acuosa e incolora) y el ADN y proteínas en la fase inferior (rojiza).

Tras el aislamiento del ARN en la fase acuosa, se transfirieron 500 μ l de la esta fase a un tubo de 1,5 ml (también libre de ARNasa). Se añadieron 250 μ l de etanol 100% puro y la mezcla se homogeneizó inmediatamente después en un vórtex durante 5 segundos para evitar la precipitación del ARN. Después se vertió la solución en una columna de filtrado (igualmente libre de ARNasa) y se centrifugó (30", temperatura ambiente; 12.000 g). Se desechó el líquido filtrado y se introdujeron 500 μ l de solución de lavado (incluida en el kit) a la columna. Tras otra centrifugación (30"; temperatura ambiente; 12.000 g) se descartó la fracción filtrada una vez más, y se añadió otra alícuota de 500 μ l de la solución de lavado, repitiendo luego el mismo proceso de centrifugación. Una vez desechado el líquido filtrado, el tubo vacío con el filtro (que contiene el ARN) se centrifugó de nuevo durante 30 segundos a temperatura ambiente y 12000g para descartar la solución de lavado residual. Para terminar, el filtro se transportó a un nuevo tubo libre de ARNasa; y se añadieron 100 μ l de tampón de elución (incluido en el kit) directamente al filtro. Después de incubarlo a temperatura ambiente durante 2 minutos, se centrifugó el tubo durante 1 minuto a temperatura ambiente y 12000 g, obteniendo el ARN en el buffer de elución.

Calidad e integridad del ARN

Para comprobar la calidad del ARN, se utiliza un dispositivo espectrofotométrico *Nanodrop* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.). Este aparato determina la concentración de RNA en ng/ μ l, la estabilidad de la cadena según la ratio 260/280 y el grado de contaminación según la ratio 260/230. Si la muestra resulta poseer unos valores aceptables para ambos parámetros y tiene una concentración suficiente, dicha muestra se puede utilizar en una prueba de expresión génica.

Retrotranscripción del ARN

Para poder realizar una prueba de expresión génica, el ARN tiene que convertirse en ADNc mediante un procedimiento de retrotranscripción (RT). En el presente estudio se utilizó el protocolo *Superscript II* (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK). Para ello, se ajusta una solución de 1 µg de ARN (calculado con el *Nanodrop*) en 10 µl de H₂O, se añade 1 µl de *hexámeros aleatorios* y 1 µl de dNTPS, todo ellos incluidos en el kit. La muestra se calienta a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y se añaden el resto de elementos de la mezcla siguiente (también incluidos en el kit): 4 µl de Buffer 5x, 2 µl de DTT 0,1M, 1 µl de RNAout y 1 µl de SSII (SuperScript; enzima de retrotranscripción). Se realiza una PCR para todas las muestras con varios ciclos de 25°C - 12 minutos, 42°C - 50 minutos, y 70°C - 15 minutos. Tras los ciclos, las muestras permanecen a 4°C hasta que se abre la tapa.

Para comprobar que la RT se ha llevado a cabo con éxito, es necesario realizar otra PCR a los productos de la PCR anterior (utilizando cebadores de ADN) y después confirmando la replicación de esa PCR en un gel de electroforesis.

Eficiencia génica y PCR cuantitativa (qPCR) de los genes estudiados

Una vez comprobado que el cDNA está correctamente transcrito, es necesario calcular las eficiencias de los genes que se van a utilizar en el ensayo. La eficiencia de un gen indica cómo se comporta su curva a lo largo del proceso de amplificación y da información sobre si se puede utilizar en un estudio de expresión. En el presente estudio, se probaron tres genes endógenos para elegir los dos con mejores resultados. También es necesario calcular la eficiencia de los genes problema en diferentes concentraciones de *primer* para elegir la que mejor amplifica. Para calcular las eficiencias, se realiza una qPCR por cada gen o concentración de *primer* que queramos testar a un pool de todas las muestras a diferentes concentraciones. Para ello, se

elabora una alícuota 1:20 de cada muestra para hacer un pool común 1:20 de todas las muestras a la vez y se realizan diluciones seriadas de 1:5 hasta obtener 4 pools (Figura 19).

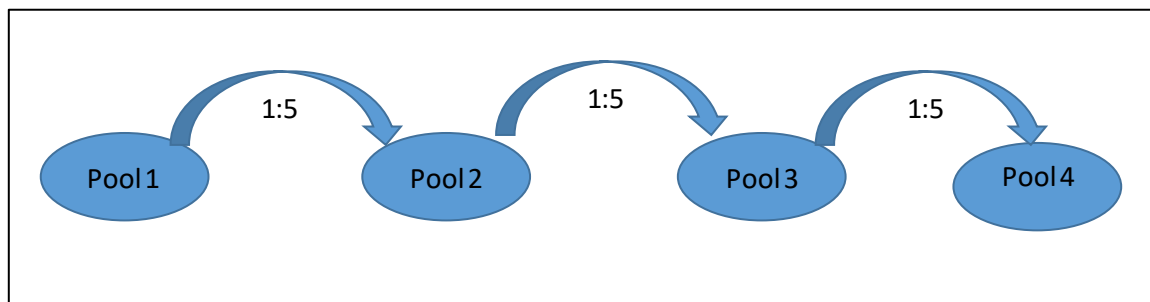


Figura 19. Diluciones seriadas del Pool 1:20 para obtener un gradiente de concentración.

Cada pool se hace por triplicado para cada gen y cada concentración. En el presente estudio, se utilizó el protocolo *SYBR Green qPCR* de Roche (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Germany). Se usó un cebador de 0,4 μl , una mezcla de 10 μl de Mix R (incluido en el kit), 7,1 μl de H_2O (también incluido en el kit) y 2,5 μl de la muestra (o pools en caso del test de eficiencias). Para un cebador de 0,6 μl , la mezcla se realizó con 10 μl de la mezcla, 6,9 μl de H_2O y 2,5 μl de la muestra, obteniendo así 20 μl de esta solución en cada pocillo. Una vez realizada la distribución de la mezcla, se llevó a la máquina de qPCR con un protocolo estándar. Una vez finalizado el procedimiento anterior, es necesario analizar los datos obtenidos y elegir qué combinación de genes y concentración es más adecuada para las muestras a analizar. Si la curva de amplificación se agrupa en 4 grupos diferentes a la misma distancia unos de otros, ello significa que la combinación es adecuada (Figura 20).

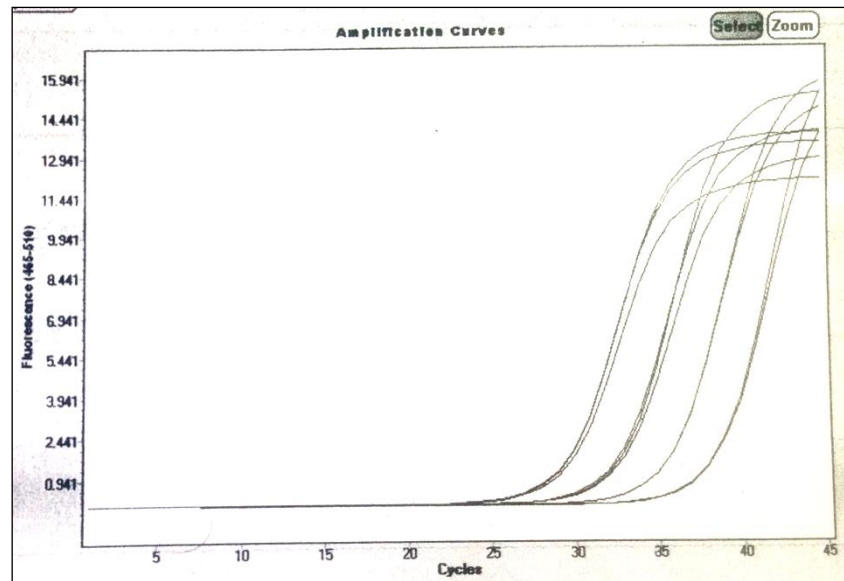


Figura 20. Curva de amplificación agrupada en 4 grupos equidistantes.

Una vez elegidos los genes endógenos, los genes de prueba y sus concentraciones, se debe repetir el proceso de qPCR, pero esta vez usando cada muestra problema. Para concluir, los datos obtenidos de la qPCR necesitan ser transformados en datos cuantificables, por lo que los datos deben ser normalizados. En el presente estudio, la normalización se calculó en relación con el valor más alto de cada gen y teniendo en cuenta los valores de los genes endógenos usando el programa de normalización *geNorm*. El valor normalizado así obtenido permite la comparación entre genes, animales o tratamientos.

Genes estudiados

En el presente experimento se analizaron los genes SCD, ME1, ACACA, FASN, EGR1, ACOX1 y ACLY (**Tabla 2**).

Tabla 2. Breve descripción de los genes utilizados en este estudio

Gen	Proteína sintetizada	Función
SCD	Stearoyl-Coenzyme A Desaturase	· Síntesis <i>de novo</i> de MUFA, en particular de oleico y palmitoleico ¹ .
ME1	Malic Enzyme	· Decarboxilación oxidativa de L-malato a piruvato. · Reducción NADP – NADPH ² .
ACACA	Acetyl-CoA Carboxylase α	· Carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA. · β -oxidación de ácidos grasos mitocondriales ³ . · Síntesis de palmitato a partir de acetil-CoA y malonil-CoA.
FASN	Fatty Acid Synthase	· Síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga ⁴ . · Síntesis <i>de novo</i> de ácido palmítico.
EGR1	Early Growth Response Gene-1	· Diferenciación celular de adipocitos, miogénesis y adipogénesis ⁵ .
ACOX	Acyl CoA Oxidase 1	· Desaturación de acil-CoA a 2-trans-enoil-CoA. · Degradación de ácidos grasos de cadena larga ⁶ . · Síntesis de acetil-CoA citosólico.
ACLY	ATP Citrate Lyase	· Biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y acetilcolina. · Conversión de citrato a oxalacetato en el ciclo de Krebs ⁷ .

¹ Flowers and Ntambi, 2008; ² Vidal et al., 2006; ³ Stachowiak et al., 2013; ⁴ Grzes et al. 2016; ⁵ Muñoz et al. 2018, Boyle et al. 2009 ⁶ Zuo et al. 2007; ⁷ Verschueren et al. 2019, Sun et al. 2015.

Con la ayuda de una herramienta online de "String-db.org", se obtuvo un mapa de interacción de estos 7 genes según la información bibliográfica actual (**Figura 21**). Este

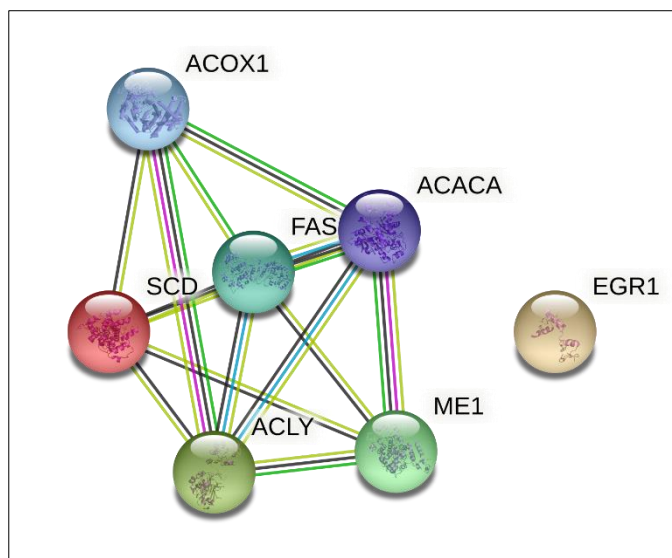


diagrama indica que todos estos genes están altamente relacionados, con la excepción de EGR1. Esto parece lógico, ya que los genes relacionados entre sí están implicados de una forma u otra con el metabolismo energético o lipídico. En cambio, el gen EGR1 está más relacionado con otros procesos diferentes, como la diferenciación de los adipocitos.

Figura 21. Diagrama de tipo Mapa String-db

Análisis estadístico y modelos

El análisis estadístico de los datos de este experimento se origina de una factorial 3 x 2, con tres genotipos (L, T y R) y dos sistemas de alimentación (CC y CM). Se llevó a cabo mediante el procedimiento de modelos lineares generalizados (GLM) del paquete estadístico SAS 9.3 (*SAS Institute Inc., Cary, NC*). Se compararon las medias mínimo-cuadráticas (LSM) y se indicaron sus errores estándar. Los efectos se consideraron significativos cuando tenían un valor $p < 0,05$. Se utilizaron los siguientes modelos según las variables analizadas:

- 1) Para analizar los datos ecográficos se utilizó un modelo que incluía el efecto del genotipo y el peso vivo como covariable.

$$y_{ijm} = \mu + Wt_i + Gen_j + e_{ijm}$$

Donde “ y_{ijm} ” es variable dependiente; “ μ ” la media del carácter; Wt_i es la covariable del peso vivo del animal; Gen_j es el genotipo donde $j =$ Torbiscal, Lampiño o Retinto; e_{ijm} es el residuo de la observación ijm .

- 2) Para analizar los datos iniciales de los parámetros sanguíneos, se utilizó un modelo que incluía el efecto del genotipo.

$$y_{jm} = \mu + Gen_j + e_{jm}$$

Donde “ y_{jm} ” es variable dependiente; “ μ ” la media del carácter; Gen_j es el genotipo donde $j =$ Torbiscal, Lampiño o Retinto; e_{jm} es el residuo de la observación jm .

- 3) Para analizar los datos ecográficos se utilizó un modelo que incluía los efectos del genotipo, el sistema de alimentación, la interacción entre genotipo y sistema de acabado y el peso vivo como covariable.

$$y_{ijklm} = \mu + Wt_i + Gen_j + FS_k + (Gen * FS)_{jk} + e_{ijklm}$$

Donde “ y_{ijklm} ” es la variable dependiente; “ μ ” la media del carácter; Wt_i la covariable de peso vivo del animal; Gen_j es el genotipo donde j = Torbiscal, Lampiño o Retinto; FS_k es el sistema de acabado donde k = Cebo de campo o montanera; $(Gen * FS)_{jk}$ es la interacción del genotipo con el sistema de alimentación; e_{ijklm} es el residuo $ijklm$.

- 4) Para analizar las diferencias entre las variables ultrasónicas se utilizó un modelo que incluía el genotipo, el sistema de alimentación, la interacción entre genotipo y sistema de alimentación, y la ganancia media diaria (GMD) durante ese período como covariable.

$$y_{ijklm} = \mu + GMD_i + Gen_j + FS_k + (Gen * FS)_{jk} + e_{ijklm}$$

Donde “ y_{ijklm} ” es la variable dependiente; “ μ ” la media del carácter; GMD_i la covariable de ganancia media diaria del animal; Gen_j es el genotipo donde j = Torbiscal, Lampiño o Retinto; FS_k es el sistema de acabado donde k = Cebo de campo o montanera, $(Gen * FS)_{jk}$ es la interacción del genotipo con el sistema de alimentación; e_{ijklm} es el residuo $ijklm$.

- 5) Para analizar los resultados de rendimientos de canal y piezas nobles, de composición de ácidos grasos, de expresión génica y de parámetros sanguíneos (finales e incrementos) se utilizó un modelo que incluía el genotipo, el sistema de alimentación, y la interacción entre genotipo y sistema de alimentación.

$$y_{jkm} = \mu + Gen_j + FS_k + (Gen * FS)_{jk} + e_{jkm}$$

Donde “ y_{jkm} ” es la variable dependiente; “ μ ” la media del carácter; Gen_j es el genotipo donde j = Torbiscal, Lampiño o Retinto; FS_k es el sistema de acabado

donde κ = Cebo de campo o montanera; $(\text{Gen}*\text{FS})_{jk}$ es la interacción del genotipo con el sistema de alimentación; e_{jkm} es el residuo $_{jkm}$.

En caso de existir una interacción estadísticamente significativa, las comparaciones se realizaron entre 6 grupos de tratamiento combinados y representado en figuras.

Las asociaciones entre las diferentes variables se analizaron mediante correlaciones de Pearson utilizando el procedimiento *CORR* de SAS (*SAS Institute Inc., Cary, NC*).

3.2. Experimento 2: Estudio del transcriptoma del músculo en tres estirpes Ibéricas acabadas en cebo de campo

Animales y medidas pre sacrificio.

Todo el manejo animal se hizo conforme al real decreto sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (RD53/2013), que contempla la directiva europea 2010/63/EU sobre la protección de los animales usados en experimentación. Los protocolos de investigación fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Extremadura.

Dieciocho cerdos ibéricos machos de tres estirpes diferentes — 6 Lampiños (**L**), 6 Torbiscuales (**T**) y 6 Retintos (**R**) — fueron alimentados con una dieta restringida de concentrados hasta que alcanzaron los 12 meses de edad. Posteriormente, la dieta se cambió de 1,8 kg/día (restringida) a *ad libitum* hasta el sacrificio. La edad y el peso corporal finales de estas estirpes fueron de 463 días (15,4 meses) y 150 kg, 453 días (15.1 meses) y 167 kg, y 468 días (15.6 meses) y 168 kg, para L, T y R, respectivamente. Se recogieron los pesos antes y después del acabado y se calcularon las ganancias medias diarias durante el periodo de acabado.

Antes del sacrificio, se pesaron los animales y se realizaron ecografías (según metodología descrita en Experimento 1). En ese momento también se extrajeron 10 ml de sangre de cada animal. Se centrifugó cada muestra sanguínea a 21°C con una rotación de 1500 g durante 10 minutos y posteriormente se recogió el suero y se congeló. En las muestras de suero sanguíneo se analizaron los niveles sanguíneos de ALT/GPT, HDL, LDL, urea, triglicéridos, colesterol, creatinina, hierro, proteínas totales y glucosa (todos en mg/dl) al final del periodo de acabado siguiendo el protocolo de BioSystems S.A. (Costa Brava 30, Barcelona, España) para cada metabolito y utilizando un analizador BA400 (Biosystems).

Mediciones y toma de muestras post-sacrificio

Se recolectaron muestras de lomo en el matadero y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para posteriormente almacenarlas a -80°C hasta realizar el análisis RNAseq. También se obtuvieron y pesaron las piezas nobles de la canal (jamón, paleta y lomo) y se calcularon los rendimientos de dichas piezas (según se describe en el Experimento 1). También se midió la longitud de la canal y la longitud y perímetro del jamón. Además, se tomaron muestras de lomo a la altura de la décima costilla para determinar el porcentaje de grasa intramuscular (**GIM**), y se recogió grasa subcutánea lumbar para analizar la composición de ácidos grasos. Las mencionadas determinaciones de composición corporal y calidad de canal y carne se realizaron siguiendo la metodología descrita en el Experimento 1.

Se determinó el pH del músculo *Longissimus dorsi* con un pH-metro de punción (Crison pH-meter mod. MicropH 2001) a los 45 minutos y a las 24 horas post-mortem. También se midió el color de las muestras de dicho músculo mediante un colorímetro Minolta CR-300, determinándose las coordenadas de color L^* , a^* y b^* de acuerdo con la metodología descrita por Cassens et al. (1995). Finalmente, se llevó a cabo el análisis de textura, cocinando las muestras (tras cortarlas adecuadamente) por inmersión en un baño de agua durante 45 min a 75°C . Después se calculó la dureza de las muestras con un texturómetro *TA-XT2i Texture Analyser* (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). En este estudio reportamos los resultados de dureza y resistencia al corte (Warner-Bratzler; **WB**) de las muestras.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la comparación de los tres genotipos para los caracteres de crecimiento, medidas ecográficas, datos metabólicos, y datos de canal y calidad de la carne se realizó mediante los procedimientos de Modelos Lineales Generalizados (GLM) del paquete SAS 9.3 (*SAS Institute Inc., Cary, NC*). Los valores significativos se asignaron a los valores de p inferiores a 0,05. Las medias de mínimos cuadrados, el error cuadrático medio del modelo y los valores de p se reportan en todas las tablas para cada carácter. Dependiendo de los caracteres se utilizaron los siguientes modelos:

1. Para analizar los datos de ultrasonido y de bioquímica sanguínea se utilizó un modelo que incluía el efecto del genotipo y el peso vivo como covariable.

$$y_{ijm} = \mu + Wt_i + Gen_j + e_{ijm}$$

Donde “ y_{ijm} ” es la variable dependiente, “ μ ” la media del carácter, Wt_i es la covariable de peso vivo del animal; Gen_j es el genotipo donde $j =$ Torbiscal, Lampiño o Retinto; e_{ijm} es el residuo $_{ijm}$.

2. Para todas las medidas realizadas en la canal y para los datos de calidad de carne se utilizó un modelo que incluía el efecto del genotipo y el peso de canal como covariable.

$$y_{ijm} = \mu + PC_i + Gen_j + e_{ijm}$$

Donde “ y_{ijm} ” es la variable dependiente, “ μ ” la media del carácter, PC_i es la covariable de peso de canal del animal, Gen_j es el genotipo donde $j =$ Torbiscal, Lampiño o Retinto; e_{ijm} es el residuo $_{ijm}$.

3. Para los perfiles de ácidos grasos se utilizó un modelo que incluía el efecto del genotipo

$$y_{jm} = \mu + Gen_j + e_{jm}$$

Donde “ y_{jm} ” es la variable dependiente, “ μ ” la media del carácter, Gen_j es el genotipo donde $j = \text{Torbiscal, Lampiño o Retinto}$; e_{ijm} es el residuo ijm .

Extracción de ARN, preparación de la biblioteca y secuenciación

El ARN se extrajo de las muestras de lomo recogidas y almacenadas a -80°C en nitrógeno líquido mediante el protocolo del kit de purificación de ARN *RiboPureTM* (Ambion, Austin, TX, EE.UU.). Para cuantificar y medir la integridad del ARN, se utilizó un equipo *NanoDrop* (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, DE, EE.UU.) y los valores RIN (RNA Integrity Number) se obtuvieron con el dispositivo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los valores RIN obtenidos para todas las muestras fueron superiores a 8, lo que indica que tienen una calidad aceptable para los procesos de secuenciación (Schroeder et al., 2006).

Además, para construir las bibliotecas *paired-end*, o de lectura desde ambos extremos, para cada muestra se utilizó el *NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Preparation Kit* (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) y después se realizó la secuenciación *multiplex* de las bibliotecas con el analizador de secuencias *Novaseq 6000* (*Illumina, Inc*, San Diego, CA, EE.UU.) en los laboratorios Novogene (*Novogene UK Company Limited*, Cambridge, Reino Unido), creando lecturas *paired-end* de 150 pares de bases (**pb**).

Análisis bioinformáticos

La calidad de los datos obtenidos por la secuenciación se evaluó mediante la aplicación *FastQC* (Babraham Bioinformatics; accesible en la página web <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Esta determinación se hizo teniendo en cuenta las longitudes de las lecturas de la secuencia y la cobertura de las bases, así como las puntuaciones de calidad de las contribuciones de los nucleótidos y las ambigüedades de las bases y las secuencias sobre-representadas. Para lograr una puntuación de control de calidad (**QC**) aceptable, todas las muestras deben tener la misma longitud, con una cobertura del 100% en todas las bases, un 25% de contribuciones de nucleótidos A, T, G y C, un 50% de contenido de pares de bases GC y menos del 0,1% de secuencias sobre-representadas.

Una vez comprobada la calidad, la secuenciación en bruto se recortó con el software *TrimGalore* (Babraham Bioinformatics; accesible en la página web http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), eliminando el adaptador de secuenciación y cualquier cola de poli-A y T, manteniendo las lecturas *paired-end* sólo cuando ambos pares alcancen más de 40 pb y estableciendo el índice de “stringency” (rigurosidad) de 6 pb como valor por defecto en el programa.

Después, el mapeo de las lecturas depuradas por el programa *TrimGalore* se llevó a cabo teniendo como referencia el genoma del cerdo (*Sscrofa11.1*) utilizando el software *Hisat2* (D. Kim et al., 2019), y utilizando después el software *HTseq-counts* (Anders, Pyl and Huber, 2015) para construir la matriz de conteo de lecturas a partir de los recuentos brutos obtenidos de genes y transcritos. Esta matriz de recuentos resultante se analizó con el paquete *Deseq2* (Love, Huber and Anders, 2014) del programa *R Studio* (Team, 2020) para las diferentes combinaciones de las tres estirpes, Lampiño vs Torbiscal (**LvsT**), Lampiño vs Retinto (**LvsR**) y Torbiscal vs Retinto (**TvsR**), buscando genes diferencialmente expresados (**DEG**) en cada comparación. Sólo se analizaron los genes con recuentos superiores a 10 lecturas.

Se determinó un gen o transcrito diferencialmente expresado cuando el *log2FoldChange* (**log2 FC**) de las diferencias de valores de expresión entre cualquiera de los tres grupos (LvsT, LvsR y TvsR) fuera inferior a -0,58 y superior a 0,58 con un valor de p inferior a 0,10.

Clasificación funcional de los genes, análisis de redes y rutas

Para analizar la funcionalidad de los DEGs obtenidos, se utilizó la información de *Gene Ontology* (**GO**) junto con el navegador *FatiGO* de *Babelomics 5* (*Babelomics 5*; <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) para la interpretación de los datos obtenidos.

El software *Ingenuity Pathway Analysis* (*IPA*, *Ingenuity Systems*, *Qiagen*, CA, USA) permitió identificar y medir las funciones biológicas, las redes de genes, las rutas canónicas y los factores reguladores de la transcripción. Además, con este software también se llevó a cabo la identificación y caracterización de las asociaciones entre los DEGs diana y las rutas canónicas, así como la identificación de las relaciones biológicas entre los genes diana en gráficos que se construyen utilizando la base de datos del programa "*ingenuity pathways knowledge base*". Este software también puede identificar los reguladores potenciales de los diferentes patrones de expresión genética de un conjunto de genes utilizando las herramientas "*upstream regulators*" y "*causal networks*". La función de estas herramientas determina si los factores de transcripción incluidos en el repositorio de la base de datos del IPA están activando o inhibiendo la expresión génica de los genes objetivo mediante la estimación de una puntuación "**z**". Esta puntuación se utiliza para evaluar la relación estadística entre el regulador y sus objetivos potenciales y también la dirección de la relación entre ellos (Krämer *et al.*, 2014).

Validación del ARN seq y análisis estadístico

Para realizar la validación, primero es necesaria la síntesis del ADNc, que se llevó a cabo mediante el protocolo del kit *Superscript II* (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y utilizando hexámeros aleatorios en una mezcla de 20 µl con 1 µg de ARN total, tal como se describe en el protocolo del kit. Se utilizó el software *Primer-blast* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para diseñar, a partir de los datos almacenados en las secuencias de *GENBANK* y *Ensembl*, los pares de cebadores (*primers*) utilizados en la cuantificación (**Tabla 3**). Se realizó una PCR del ADNc recién sintetizado para cada cebador con el fin de comprobar si los primers funcionaban y verificar el tamaño de los amplicones. Una vez verificado el ADNc, se realizó la qPCR utilizando el protocolo *SYBR Green Mix* (Roche, Basilea, Suiza) en un *LightCycler480* (Roche, Basilea, Suiza) y la cuantificación y el análisis de los datos se realizó con el software *LightCycler480 SW1.5* (Roche, Basilea, Suiza). Las muestras se procesaron por triplicado y se analizaron las curvas de disociación para identificar el patrón de amplificación de cada gen. La eficiencia de la PCR se calculó utilizando cuatro diluciones de ADNc y calculando la curva estándar. Los valores medios del punto de cruce (C_T) se definen como el número del ciclo de PCR en el que la curva indicadora de la de la reacción corta la línea del umbral. Estos valores se utilizaron para realizar el análisis estadístico. Los resultados de los genes endógenos TBP y B2M se introdujeron en el software *Genorm* (Vandesompele et al., 2002) para calcular los valores de estabilidad. Después, para normalizar los datos, los valores obtenidos de la qPCR de los genes diana se dividieron por las medias geométricas de los valores de TBP y B2M. Para el proceso de validación del ARN-seq, se calculó la correlación de Pearson entre los valores obtenidos del RNAseq y la qPCR, así como el coeficiente de correlación de concordancia de Lin (**CCC**) entre los valores de *FoldChanges* del ARN-seq y la qPCR para conocer como de relacionados están las dos pruebas, (Miron et al., 2006).

Tabla 3. Primers de los genes utilizados en la Validación de RNAseq

	Secuencia (5'->3')	Longitud
qF ACTA1	CCATGTGTGACGAAGACGAG	20
qR ACTA1	TGACCCATACCCACCATGAC	20
qF COL3A1	ATGGTCATGGACCTCAAGGC	20
qR COL3A1	GCCACCAGTAGGGCATGATT	20
qF FADS2	TTTGTCTGGGAGAAAGGCA	20
qR FADS2	AGGACACCGTAGAAAGGGCT	20
qF MYL1	ACAGAACAGGCGAATGCAAG	20
qR MYL1	TGCATTGGTGGGATTTGTGC	20
qF AGPAT3	GAGATCGACTTCCTCTGCGG	20
qR AGPAT3	GCTTCAGTCCTTCGACCACA	20
qF GPX1	GCTGCTCATTGAGAACGTAGC	21
qR GPX1	GAAGAGCGGGTGAGCATTTG	20
qF FES	CACCAGGAGATGGCGAACAT	20
qR FES	TCAAGCAGCGACTCGTCAAA	20
qF ACTC1	ATCGCATGCAAAAGGAAATCACTG	24
qR ACTC1	TGGGCCTGCCTCATCATACTCTT	23
qF B2M	TTCACACCGCTCCAGTAG	18
qR B2M	CCAGATACATAGCAGTTCAGG	21
qF DNAJA1	ATTGAAAAAGGCTTACAGGAACT	24
qR DNAJA1	GGGGGAGCCAAAACCACCAC	20
qF FOS	ATCCCAACGGTGACTGCTATCTCG	24
qR FOS	TGCCCTTCTGCCAATGCTCT	21
qF TBP	GATGGACGTTTCGGTTTAGG	19
qR TBP	AGCAGCACAGTACGAGCAA	19
qF VEGFA	CATCTTCAAGCCGTCCTGTGT	21
qR VEGFA	TTTTCTTGCCTCGCTCTATCTTT	23
qF PVALB	AAGACGCTGATGGCTGCTGGAGAC	24
qR PVALB	ATAAGGGATGGGGGAGTAATA	22

qF = primer Forward; qR = primer Reverse

4. Resultados

4.1. Resultados del Experimento 1

4.1.1. Composición corporal ecográfica durante el acabado

En la **Tabla 4**, se representan las medias de las variables de composición corporal (deposición grasa y acreción muscular) medidas con ultrasonido al inicio de la fase de acabado para las tres estirpes de cerdo Ibérico estudiadas: Lampiño, Torbiscal y Retinto.

Tabla 4. Medias mínimo-cuadráticas de las medidas ecográficas justo antes de la fase de acabado en las tres estirpes estudiadas

Carácter	Uni.	Genotipo			RMSE	p-valor
		L	T	R		
EGLUi	cm	5,10	5,04	5,17	0,385	0,573
GGLUi	cm	2,68	2,70	2,93 ^a	0,315	0,021
ASTi	cm ²	12,92	12,62	12,01	2,031	0,352
GSTi	cm	1,99	1,81	1,98	0,256	0,105
ACHi	cm ²	18,83	20,23 ^a	18,64	1,717	0,016
ECHi	cm	2,99	3,31 ^a	3,09	0,307	0,015
GDIi	cm	1,45 ^a	1,00	1,135	0,208	<,0001
GDMi	cm	2,27 ^b	1,97 ^c	2,66 ^a	0,377	<,0001
GDEi	cm	1,01 ^{ab}	1,08 ^a	0,93 ^b	0,156	0,014
GDTi	cm	4,72	4,05 ^a	4,94	0,533	<.0001

L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; Uni. = Unidades; RMSE= Raíz del error cuadrático medio; i (inicial) = la i final en las siglas de caracteres indica que son medidas iniciales, tomadas antes de la fase de acabado; EGLU = Espesor Glúteo (profundidad); GGLU = Grasa Glútea (subcutánea; espesor); AST = Área del Semitendinoso (muscular); GST = Grasa sobre Semitendinoso (subcutánea; espesor); ACH = Área de la Chuleta (lomo); ECH = Espesor Chuleta (profundidad del lomo); GDI = Grasa Dorsal Interna (espesor de la capa profunda de la grasa subcutánea dorsal); GDM = Grasa Dorsal Media (espesor de la capa intermedia); GDE = Grasa Dorsal Externa (espesor de la capa más superficial); GDT = Grasa Dorsal Total (espesor total de las capas de grasa subcutánea dorsal. Entre las columnas de genotipo, valores con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

En relación a las medidas de acreción muscular, como son el espesor del glúteo (**EGLUi**), el área del semitendinoso (**ASTi**) y el área y espesor de la chuleta (**ACHi** y **ECHi**, respectivamente), no hubo diferencias significativas entre los tres genotipos en cuanto al tercio posterior (EGLUi y ASTi) pero sí para el lomo, pues ACHi y ECHi fueron

significativamente más grandes para la estirpe Torbiscal que para las otras dos, y entre estas últimas no hubo diferencias. En relación a las medidas de deposición grasa, como son el espesor de la grasa glútea (**GGLUi**), el espesor de la grasa a nivel de semitendinoso (**GSTi**) y el espesor de la grasa dorsal (**GDTi**) y de cada una de sus capas — interna (**GDli**), media (**GDMi**) y externa (**GDEi**) —, la estirpe Retinta tuvo más grasa de cobertura dorsal y glútea (**GDMi**, **GGLUi**), mientras que la Torbiscal tuvo menos grasa de cobertura dorsal (**GDli**, **GDMi**, **GDTi**), aunque su capa externa (**GDEi**) fue más fina que la de la Retinta. En resumen, antes del inicio de la fase de finalización, la estirpe Torbiscal tenía el lomo más profundo que las demás y la capa externa de la grasa dorsal más espesa, pero la grasa dorsal total menos espesa que las otras dos estirpes, mientras que la Retinta fue la que tuvo mayor grasa de cobertura, tanto en el tercio posterior como sobre el lomo.

En la **Tabla 5** se muestran las mismas mediciones anteriores realizadas en los mismos animales al final (**f**) de la fase de acabado, justo antes del sacrificio, así como la diferencia (**d**) entre los valores iniciales y finales durante la fase de acabado, y además los valores se comparan entre genotipos y entre sistemas de acabado. En cuanto al genotipo, tras el acabado (en contraste con las medidas iniciales) sí que hubo diferencias significativas en muscularidad del tercio posterior, siendo la estirpe Retinta la que tuvo mayor profundidad glútea (**EGLUf**), y la Lampiña la que tuvo el semitendinoso más robusto (**ASTf**). En cuanto a grasa de cobertura, **GDIf** y **GDTf** fueron significativamente más gruesas en la estirpe Retinta que en la Torbiscal, pero sin diferencias entre cada una de ellas con la Lampiña, que presentó valores intermedios. Con relación al sistema de alimentación, los animales acabados en montanera presentaron un músculo semitendinoso más robusto (mayor **ASTf**) y en general más grasa de cobertura (**GSTf**, **GDIf**, **GDMf**, **GDEf** y **GDTf**) que los acabados en cebo de campo, mientras que los animales finalizados en este último sistema presentaron mayor profundidad de lomo (**ECHf**).

Asimismo, en relación a los cambios en composición corporal durante el acabado (**Tabla 5**), es importante resaltar que, aunque para los caracteres musculares o grasos ACHd, GDId, GDTd, ASTd y ECHd no hubo diferencias significativas entre los genotipos, el espesor de la musculatura glútea (EGLU) creció más en R que en T (2,08 vs 1,57, respectivamente), a pesar de que T partió de una mayor profundidad de lomo en la medición inicial. En cuanto al sistema de alimentación, cabe destacar un mayor incremento del área del semitendinoso (ASTd) durante la montanera que durante el cebo de campo (3,94 vs 1,76 cm², respectivamente; **Tabla 5**).

Con estos resultados se ha realizado un gráfico del crecimiento porcentual de estas medidas (**Figura 22**), usando como 100% el valor final y luego representando como componentes de ese 100% los valores antes del acabado (iniciales) y la diferencia entre el valor final y el inicial (incremento) en otro color. Así puede valorarse el crecimiento relativo de cada componente en función de sus valores finales. Con este tipo de representación puede verse claramente cómo los caracteres musculares crecen mucho menos proporcionalmente (26% como máximo en el EGLU) que las capas grasas, que algunas aumentan cerca de un 50% de su espesor inicial durante la fase de acabado.

Tabla 5. Medias mínimo-cuadráticas de las medidas ecográficas pre-sacrificio y el incremento durante el periodo de acabado.

Carácter	uni	Genotipo			S.A.			P-Valor			Int
		L	T	R	CC	CM	RMSE	Gen.	S.A.		
Caracteres pre-sacrificio											
EGLUf	cm	6,65	6,85	7,27 ^a	6,98	6,87	0,622	0,010	0,583	NS	
GGLUf	cm	4,06	4,09	3,94	4,10	3,96	0,520	0,578	0,400	**	
ASTf	cm ²	16,79 ^a	14,73	15,08	14,94	16,13 ^a	1,934	0,042	0,050	NS	
GSTf	cm	3,50 ^a	3,02	3,00	3,01	3,34 ^a	0,378	0,004	0,007	**	
ACHf	cm ²	24,93	25,85	24,56	25,89	24,34	3,157	0,408	0,117	NS	
ECHf	cm	3,49	3,68	3,58	3,81 ^a	3,36	0,444	0,591	0,002	NS	
GDIf	cm	2,42 ^{ab}	2,21 ^b	2,43 ^a	2,14	2,57 ^a	0,343	0,097	0,000	NS	
GDMf	cm	4,89	4,25 ^a	5,13	4,59	4,92 ^a	0,634	0,000	0,092	**	
GDEf	cm	1,45	1,72 ^a	1,31	1,41	1,57 ^a	0,240	<,0001	0,033	**	
GDTf	cm	8,76 ^{ab}	8,19 ^b	8,87 ^a	8,14	9,07 ^a	0,857	0,037	0,001	NS	
Incremento durante el acabado											
EGLUd	cm	1,71 ^{ab}	1,57 ^b	2,08 ^a	1,87	1,70	0,665	0,045	0,446	NS	
GGLUd	cm	1,43 ^a	1,31 ^{ab}	1,03 ^b	1,26	1,25	0,497	0,038	0,949	**	
ASTd	cm ²	3,08	2,52	2,95	1,76	3,94 ^a	2,274	0,749	0,008	NS	
GSTd	cm	1,52 ^a	1,29 ^{ab}	1,07 ^b	1,10	1,49 ^a	0,342	0,001	0,002	**	
ACHd	cm ²	6,03	6,21	5,85	6,13	5,92	2,833	0,918	0,823	NS	
ECHd	cm	0,52	0,33	0,46	0,57	0,30	0,500	0,518	0,127	NS	
GDId	cm	0,96	1,14	1,13	1,01	1,14	0,374	0,310	0,322	NS	
GDMd	cm	2,80 ^a	2,07 ^b	2,48 ^{ab}	2,31	2,58	0,712	0,011	0,269	**	
GDEd	cm	0,47	0,61 ^a	0,41	0,43	0,56	0,213	0,010	0,097	**	
GDTd	cm	4,23	3,81	4,01	3,76	4,28	1,013	0,463	0,137	**	

L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; CC= dieta de concentrado; CM = Dieta de montanera; RMSE= Raíz del error cuadrático medio; Gen. = Genotipo; S.A. = Sistema de alimentación; Int = Interacción; -f = la f final indica que son medidas después de la fase de acabado; -d = la d final indica que son los incrementos durante el periodo de cebo; EGLU = Espesor Glúteo (profundidad); GGLU = Grasa Glútea (subcutánea; espesor); AST = Área del Semitendinoso (muscular); GST = Grasa sobre Semitendinoso (subcutánea; espesor); ACH = Área de la Chuleta (lomo); ECH = Espesor Chuleta (profundidad del lomo); GDI = Grasa Dorsal Interna (espesor de la capa profunda de la grasa subcutánea dorsal); GDM = Grasa Dorsal Media (espesor de la capa intermedia); GDE = Grasa Dorsal Externa (espesor de la capa más superficial); GDT = Grasa Dorsal Total (espesor total de las capas de grasa subcutánea dorsal). Entre las columnas de genotipo, valores con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

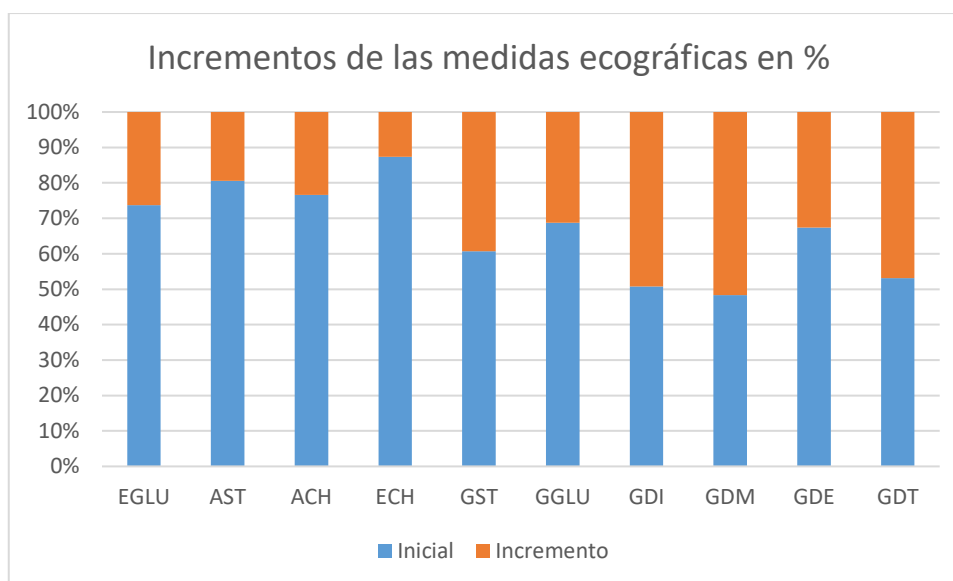


Figura 22. Gráfica que representa el crecimiento proporcional de cada medida ecográfica durante la fase de acabado, independientemente del genotipo o sistema de alimentación. EGLU = Espesor del músculo glúteo; GGLU = Espesor de la grasa del glúteo; AST = Área del músculo semitendinoso; GST = Espesor de la grasa a nivel del semitendinoso; ACH = Área de la chuleta; ECH = Espesor de la chuleta; GDI = Espesor de la capa interna de la grasa dorsal; GDM = Espesor de la capa media de la grasa dorsal; GDE = Espesor de la capa externa de la grasa dorsal; GDT = Espesor de todas las capas de la grasa subcutánea dorsal

En cuanto a las interacciones genotipo y el sistema de acabado, se observaron unas interacciones significativas entre ambos factores para los caracteres GGLUf, GSTf, GDMf Y GDEf, que se describen desde la **Figura 23** a la **Figura 26**, así como para los caracteres GGLUd, GSTd, GDMd, GDEd y GDTd, que se describen en la **Figura 27** y la **Figura 28**.

Entre los caracteres que presentaron interacciones, cabe destacar que la grasa sobre el glúteo (GGLUf; **Figura 23**) curiosamente fue mayor en los Lampiños de cebo que en los de montanera, pero lo contrario ocurrió con los Torbiscales, en los que la grasa supraglútea fue más gruesa en los animales de montanera. En los Retintos, en cambio, el sistema de acabado no afectó a la grasa de cobertura glútea.

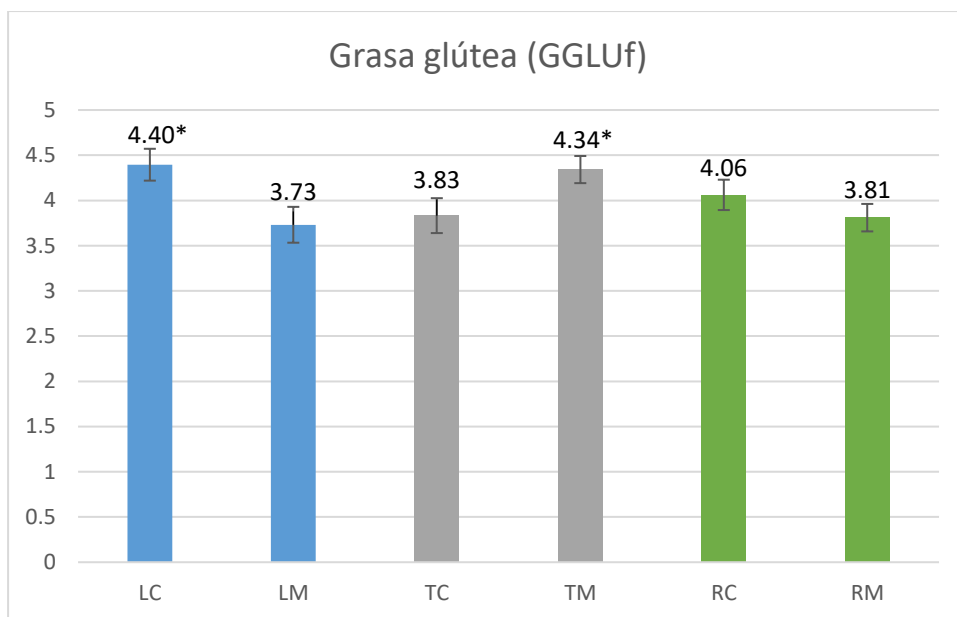


Figura 23. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa glútea (GGLUf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.

En relación a la grasa a nivel del semitendinoso (GSTf; **Figura 24**), ésta fue igual en Lampiño de cebo y montanera y a su vez mayor en Lampiño que en las otras dos estirpes. En cambio, para las estirpes R y T, esta cobertura grasa tuvo mayor espesor en los animales de montanera que en los de cebo. En resumen, la estirpe Lampiña tuvo la cobertura grasa más gruesa sobre el semitendinoso y sin afectarle el sistema de acabado, mientras que en Retinto y Torbiscal esta capa se desarrolló más durante la montanera que durante el cebo de campo.

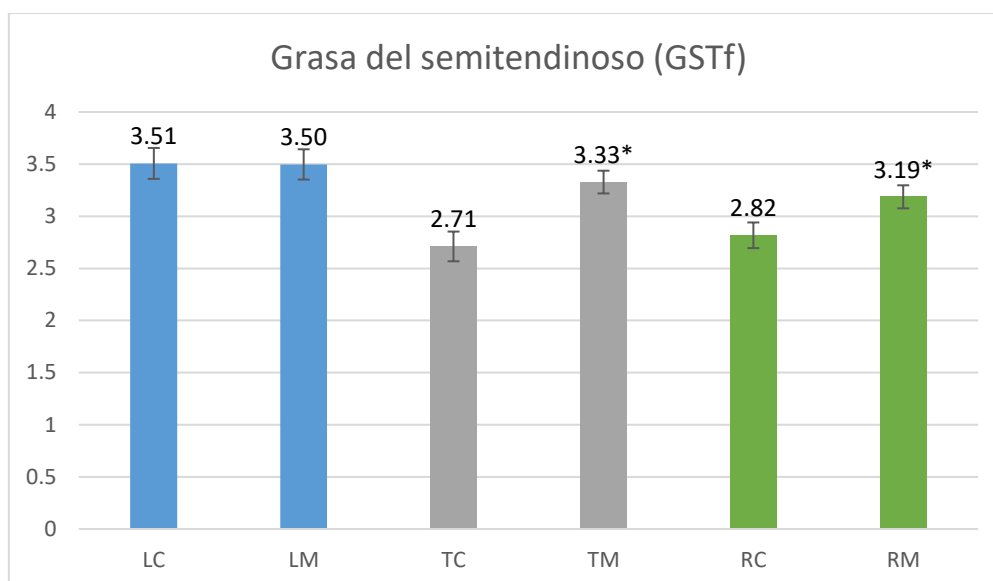


Figura 24. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa del semitendinoso (GSTf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.

En relación a la grasa dorsal, capa media (GDMf) no hubo diferencias entre sistema de cebo de campo y montanera para las estirpes L y R, pero el grosor de esta capa fue significativamente menor en los Torbiscuales de cebo de campo que en los de montanera (**Figura 25**).

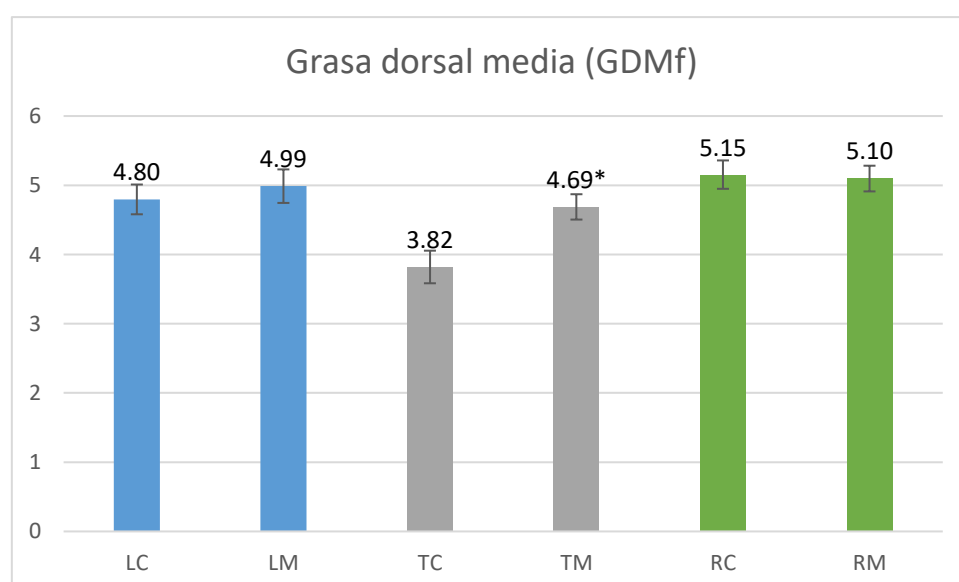


Figura 25. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa dorsal media (GDMf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.

De otro lado, la capa externa de grasa dorsal (GDEf) fue menor en los T y R de cebo de campo que en los de montanera, pero en los Lampiños fue igual en los dos sistemas (**Figura 26**).

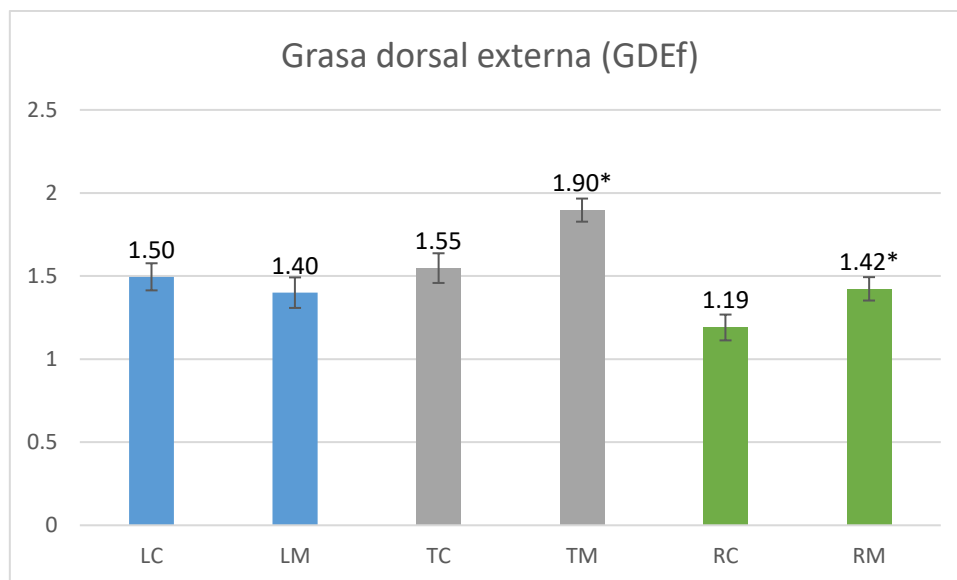


Figura 26. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de la grasa dorsal externa (GDEf) después del acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscales; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.

Respecto a las interacciones genotipo x sistema para los caracteres que miden la diferencia entre el inicio y el final del acabado, hubo varios casos reseñables (**Figura 27**): El crecimiento de la grasa supraglútea (GGLUd) en los Lampiños fue mayor en cebo de campo, en los Torbiscales fue mayor en montanera, y no hubo efecto del sistema para los Retintos. El crecimiento de la grasa que cubre el semitendinoso (GSTd) fue mayor en montanera para los T y R, mientras que para los L no hubo efecto del sistema. Finalmente, para la mayoría de los caracteres de la grasa dorsal (**Figura 28**; GDMd, GDEd y GDTd), no hubo diferencias entre sistemas para los L y R, mientras que en los Torbiscales hubo incrementos significativamente mayores en montanera que en cebo. Observando los resultados de las interacciones relativas a las mediciones de los espesores grasos, se puede afirmar que son debidas mayormente a que la Torbiscales deposita significativamente más grasa en montanera que en cebo.

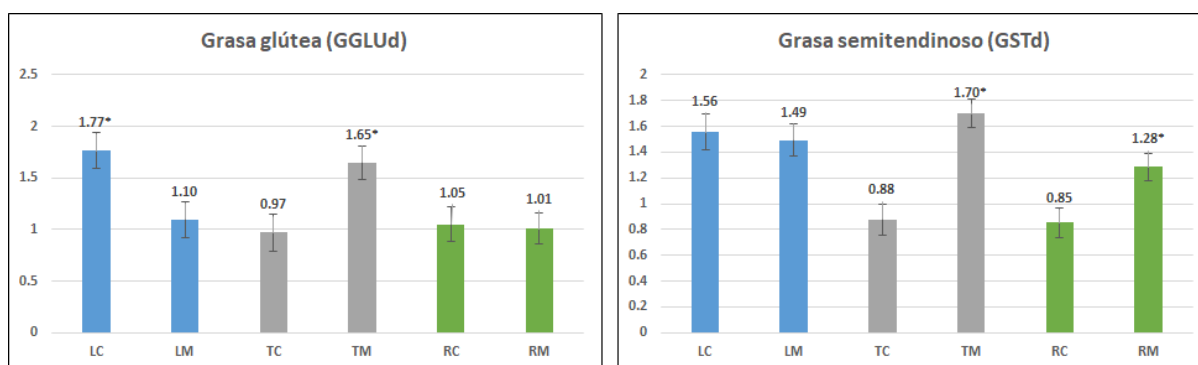


Figura 27. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de las variaciones de la grasa en la zona glútea (GGLUd) y en la zona del semitendinoso (GSTd) durante el acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.

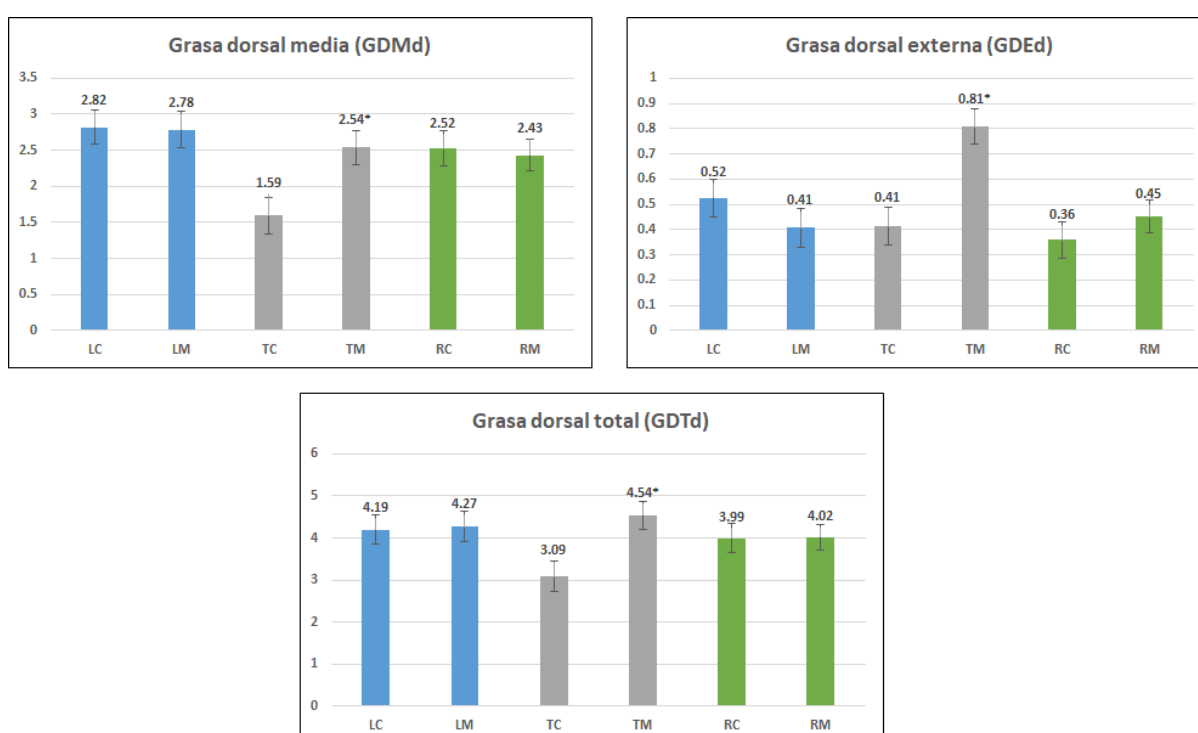


Figura 28. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de las variaciones de las capas de grasa subcutánea dorsal media (GDMd), externa (GDEd) y total (GDTd) durante el acabado en cm. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = dieta de concentrado; M = dieta de montanera.

4.1.2. Parámetros metabólicos sanguíneos durante el acabado

Los parámetros bioquímicos en el suero al inicio de la fase de cebo están descritos en la **Tabla 6**. Los niveles de urea y triglicéridos en sangre son significativamente mayores en la estirpe Lampiña que en las otras dos, y los niveles de fructosamina son mayores en T que en R, pero similares a los de L. Para el resto de parámetros séricos estudiados, como lactato, glucosa y colesterol, no hay diferencias significativas entre las tres estirpes.

Tabla 6. Medias mínimo-cuadráticas de los parámetros sanguíneos en mg/dl antes de la fase de acabado

Carácter	Genotipo			RMSE	P-valor
	L	T	R		
UREAi	47,79 ^a	40,60	37,39	8,909	0,003
TRLi	81,37 ^a	46,39	61,17	30,919	0,007
LACi	34,52	25,61	27,90	13,060	0,136
GLUi	70,01	68,64	68,94	9,741	0,915
FRUi	242,80 ^{ab}	247,06 ^a	228,81 ^b	25,232	0,047
COLi	107,72	97,26	107,78	20,089	0,182

L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; RMSE= Raíz del error cuadrático medio; -i = la i final indica que son medidas antes de la fase de acabado; TRI = Triglicéridos; LAC = Lactato; GLU = Glucosa; FRU = Fructosamina; COL = Colesterol. Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

La **Tabla 7** muestra los mismos parámetros pero medidos al final de la fase de acabado. No hubo diferencias en los niveles de urea, lactato, fructosamina, y colesterol entre los tres genotipos, pero los niveles de Triglicéridos y Glucosa son significativamente mayores en la estirpe R que en las otras dos estirpes. Los niveles de urea, triglicéridos, lactato y glucosa en sangre son mayores para los animales de cebo de campo que para los de montanera. Existe una interacción significativa entre genotipo y alimentación para los niveles de glucosa (ver también la **Figura 29**), de

forma que son iguales en los Lampiños de cebo y montanera, pero para las otras dos estirpes son significativamente más altos en los animales de cebo que en los de montanera.

Tabla 7. Medias mínimo-cuadráticas de los valores metabólicos en mg/dl antes del sacrificio y el incremento en este periodo.

Carácter	Genotipo			S.A.			P-Valor		
	L	T	R	CC	CM	RMSE	Gen.	S.A.	Int
Carácter post acabado									
UREAf	46,09	41,50	41,85	55,77 ^a	30,52	9,898	0,536	<,0001	NS
TRIf	83,56	78,58	125,07 ^a	112,63 ^a	78,85	32,702	0,000	0,007	NS
LACf	30,94	34,93	37,76	39,95 ^a	29,14	11,209	0,295	0,010	NS
GLUf	72,52	74,63	82,18 ^a	82,49 ^a	70,39	7,073	0,001	<,0001	**
FRUf	240,79	202,58	224,91	214,43	231,10	46,750	0,213	0,322	NS
COLf	140,07 ^{ab}	116,83 ^b	152,43 ^a	136,28	136,61	35,935	0,024	0,979	NS
Incremento durante el acabado									
UREAd	1,81 ^{ab}	-4,22 ^b	5,98 ^a	21,44 ^a	-19,07	11,981	0,063	<,0001	*
TRId	15,30	18,29	68,77 ^a	77,39 ^a	-9,14	38,524	0,000	<,0001	*
LACd	0,01	5,06	10,20	14,22 ^a	-4,03	15,187	0,140	0,003	NS
GLUd	2,43	7,89	15,41 ^a	14,85 ^a	2,31	9,018	0,000	0,001	**
FRUd	-3,35	-8,64	-2,94	-11,58	1,62	32,013	0,866	0,288	*
COLd	36,17	33,89	44,23	29,06	47,13	28,379	0,531	0,108	NS

L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; CC= dieta de concentrado; MF = Dieta de montanera; RMSE= Raíz del error cuadrático medio; Gen. = Genotipo; S.A. = Sistema de alimentación; Int = Interacción; -f = la f final indica que son medidas después de la fase de acabado; -d = la d final indica que son los incrementos durante el periodo de cebo; GMD = Ganancia media diaria durante el cebo; TRIG = Triglicéridos; LAC = Lactato; GLU = Glucosa; FRU = Fructosamina; COL = Colesterol. * = P-valor menor de 0.10; ** = P-valor menor de 0.05. Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

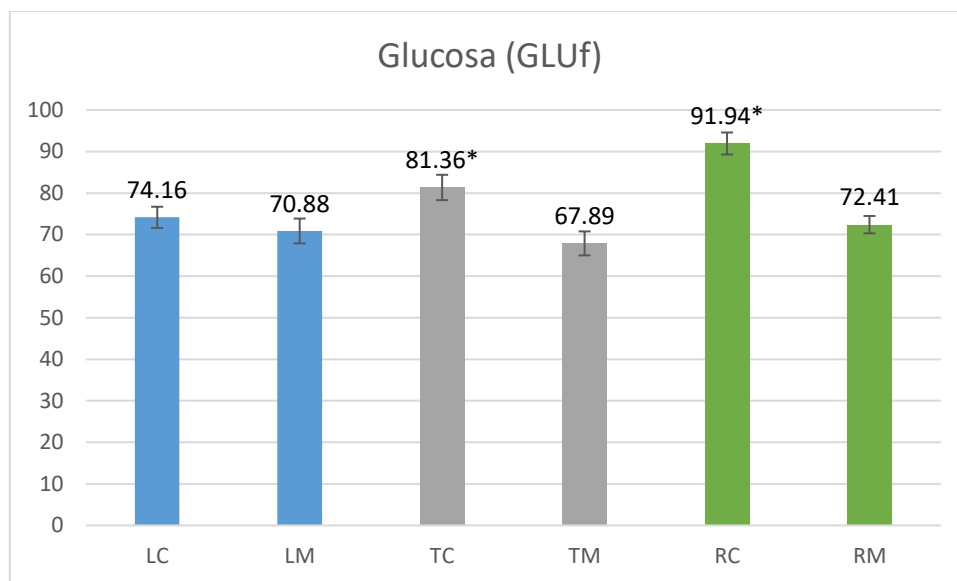


Figura 29. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los valores de Glucosa después del acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

Si evaluamos las diferencias o cambios que se producen en estos parámetros durante la fase de acabado (**Tabla 7**) se obtiene que los niveles de Urea se incrementan en Retinto y disminuyen en Torbiscal, siendo significativas estas diferencias, mientras que no hay diferencias entre ellas con la estirpe Lampiña. Por otra parte, los niveles de triglicéridos y glucosa se incrementan significativamente más en Retinto que en las otras dos estirpes, manteniéndose similares los incrementos de colesterol en las tres estirpes. En relación al sistema de alimentación, los niveles de urea, triglicéridos, lactato y glucosa en sangre se incrementan considerablemente más en los animales de cebo que en los de montanera, mientras que no hay diferencia en los incrementos de colesterol y fructosamina entre los dos sistemas de alimentación.

Por otro lado, algunos parámetros presentan una interacción genotipo x sistema significativa, así los incrementos de urea son negativos en animales de montanera y positivos en los de cebo, siendo estas variaciones diferentes entre las tres estirpes (**Figura 30**).

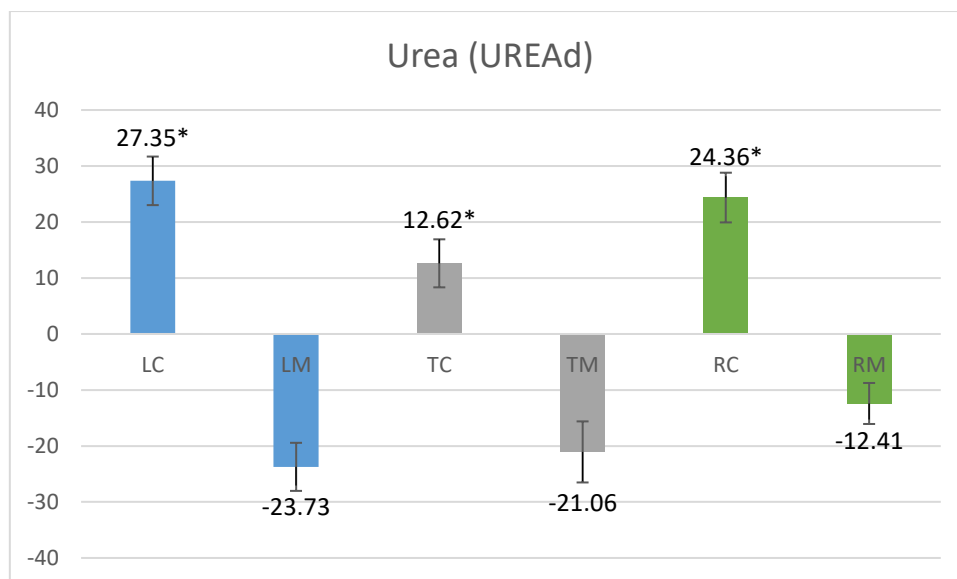


Figura 30. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los cambios de concentración Urea en sangre durante el cebo en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

En relación a los triglicéridos, los Retintos presentaron cambios mucho más elevados que las otras estirpes durante el cebo, y a su vez, esos cambios también fueron mucho más elevados que durante la montanera, a pesar de que los incrementos en los dos sistemas fueron positivos, al revés que en L y T, para los que los cambios en triglicéridos en los animales de montanera fueron negativos (**Figura 31**).

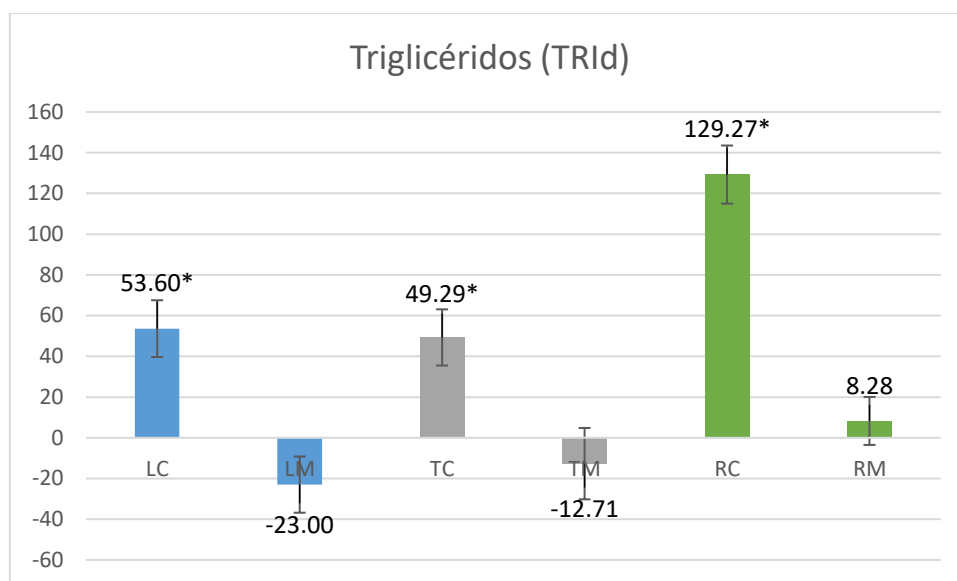


Figura 31. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los incrementos de Triglicéridos durante el acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

Además, los niveles de glucosa fueron los que tuvieron la interacción más significativa, ya que cada estirpe se comportó de una manera diferente: Los Lampiños tuvieron un escaso incremento en los niveles de glucosa, tanto en cebo como en montanera. Sin embargo, en las otras dos estirpes (R y T) hubo una diferencia significativa entre los cambios ocurridos en uno y otro sistema, siendo los incrementos de glucemia mucho mayores durante el cebo que durante la montanera, habiendo incluso un decremento durante la montanera del Torbiscal (**Figura 32**).

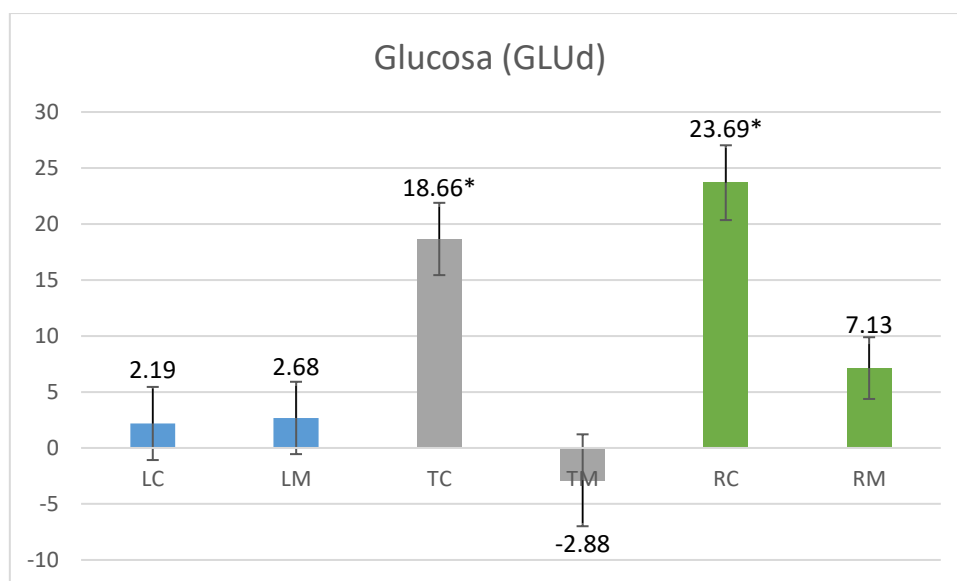


Figura 32. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los incrementos de Glucosa durante el acabado en mg/dl. L= Lampiño; T= Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

Finalmente, en cuanto a los niveles de fructosamina (**Figura 33**), aunque fue el parámetro que presentó una mayor variabilidad, con errores estándar muy elevados, la diferencia de valores entre sistemas alcanzó la significación para los Retintos, siendo un decremento en cebo y un incremento en montanera.

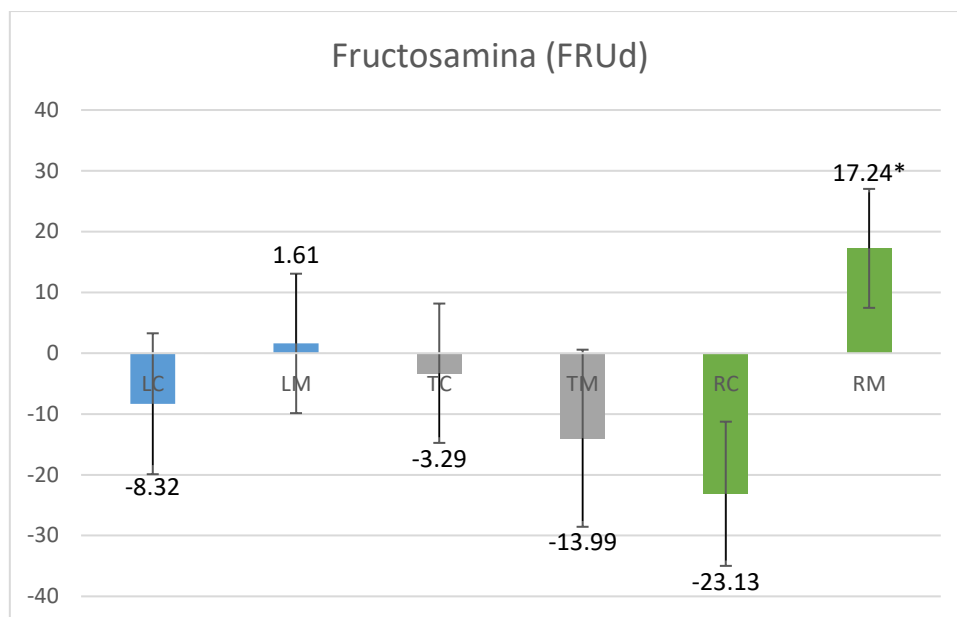


Figura 33. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema de los incrementos de Fructosamina durante el acabado en mg/dl. L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

Para poder comprender mejor la relación entre los diferentes caracteres de composición corporal de un lado, y de otro entre los parámetros sanguíneos, se llevó a cabo un estudio de las correlaciones entre algunos de estos valores. Se compararon los caracteres ecográficos de deposición grasa a principio *versus* al final de la fase de acabado (**Tabla 8**), resultando que hubo mayor correlación entre los distintos depósitos grasos al inicio de la fase de acabado que al final. Más específicamente, al inicio de la fase de acabado, el espesor de grasa supraglútea (GGLU) estuvo más asociada con la grasa sobre el semitendinoso (GST), la grasa dorsal (GDT) y su capa media (GDM) que con los otros depósitos grasos. En esa fase, la capa grasa interna dorsal estuvo más relacionada con la capa media y el espesor graso dorsal total, y la GDM fue la más asociada a la GDT. Estas correlaciones disminuyeron al final de la fase de acabado e incluso las tendencias también cambiaron, como es el caso, por ejemplo, de la baja (disminuida) asociación final entre GGLU, GDM y GDT y el aumento final de la asociación entre la grasa supraglútea, la grasa sobre el semitendinoso y la grasa dorsal externa.

Tabla 8. Coeficientes de correlación entre los distintos caracteres de deposición grasa al principio y al final del acabado.

Carácter		GGLU	GST	GDI	GDM	GDE	GDT
GGLU	I	1	0.37*	0.31*	0.56*	0.27*	0.57*
	F	1	0.29*	0.04	0.15	0.39*	0.27*
GST	I		1	0.24	0.34*	0.14	0.36*
	F		1	0.16	0.19	0.35*	0.34*
GDI	I			1	0.48*	0.10	0.71*
	F			1	0.23	0	0.57*
GDM	I				1	0.27*	0.92*
	F				1	0	0.86*
GDE	I					1	0.48*
	F					1	0.39*
GDT	I						1
	F						1

I = Comparaciones de ambos caracteres antes de la fase de acabado; F = Comparación de ambos caracteres después de la fase de acabado; GGLU = Espesor de la grasa del glúteo; GST = Espesor de la grasa a nivel del semitendinoso; GDI = Espesor de la capa interna de la grasa dorsal; GDM = Espesor de la capa media de la grasa dorsal; GDE = Espesor de la capa externa de la grasa dorsal; GDT = Espesor de todas las capas de la grasa subcutánea dorsal. Los valores con * indican correlaciones con P-valor < 0,05.

Las asociaciones entre los cambios en la bioquímica sanguínea (**Tabla 9**), indican que los incrementos en uremia estuvieron asociados a incrementos en triglicéridos, lactato y glucosa, pero no se asociaron a los cambios en fructosamina o colesterol. No hubo ninguna asociación entre los incrementos de triglicéridos y los de fructosamina, pero si hubo una asociación entre los cambios en triglicéridos y el cambio del resto de variables estudiadas. Finalmente, cabe destacar que los cambios en fructosamina no se asociaron a cambios en ninguna variable estudiada, excepto a los incrementos en colesterol.

Tabla 9. Correlación del incremento de caracteres metabólicos durante el acabado.

Carácter	UREAd	TRId	LACd	GLUd	FRUd	COLd
UREAd	1	0,68*	0,43*	0,32*	0,00	-0,03
TRId		1	0,45*	0,55*	0,15	0,29*
LACd			1	0,37*	-0,10	-0,08
GLUd				1	0,07	0,00
FRUd					1	0,29*
COLd						1

-d = la d final indica que son los cambios en las medidas durante el acabado; TRI = Triglicéridos; LAC = Lactato; GLU = Glucosa; FRU = Fructosamina; COL = Colesterol. Los valores con * indican correlaciones con P-valor < 0,05.

4.1.3. Calidad de canal y metabolismo lipídico

Características de canal

Las 3 estirpes ibéricas, a una edad similar, presentaron diferente altura a la grupa y peso corporal pre-sacrificio: 73,9, 83,5 y 79,8 cm, y 155,2, 169,5 y 165,4 Kg para los genotipos L, T y R, respectivamente. Los caracteres fenotípicos relacionados con la calidad de la canal se muestran en la **Tabla 10**. Hubo diferencias significativas en el rendimiento de las piezas nobles entre los genotipos. Así, la estirpe Torbiscal tuvo mayores rendimientos de jamón y lomo que la Retinta y similar rendimiento de jamón que la Lampiña. Entre L y R, estos rendimientos fueron similares, con la excepción del rendimiento de paleta, que fue mayor para L que para R. La estirpe Retinta tuvo el mayor contenido de grasa intramuscular (GIM; $p < 0,079$), además de significativamente mayor espesor de grasa dorsal total y espesor de la capa interna de la grasa dorsal que T. Los valores de la grasa dorsal de L no fueron significativamente diferentes a los de T y R. En relación al sistema de alimentación, los cerdos alimentados en cebo de campo tuvieron mayores rendimientos de piezas nobles que los alimentados en *montanera*.

Tabla 10. Medias mínimo-cuadráticas de los caracteres de la canal por genotipo, sistema de alimentación, y la interacción entre ambos

Caracter	uni	Genotipo			S.A.			Gen.	P-Valor	
		L	T	R	CC	CM	RMSE		S.A.	Int.
Jamón	%	0,222 ^{ab}	0,225 ^a	0,218 ^b	0,224 ^a	0,218	0,000	0,009	0,001	NS
Paleta	%	0,157 ^a	0,165	0,166	0,163	0,162	0,000	0,002	0,534	NS
Lomo	%	0,025	0,027 ^a	0,024	0,027 ^a	0,024	0,000	<,0001	<,0001	NS
P. nobles	%	0,404	0,417 ^a	0,407	0,415 ^a	0,404	0,000	0,002	0,001	NS
GIM	%	3,980	4,140	6,310 [*]	4,670	4,960	1,796	0,079	0,449	NS

uni = Unidades; int= Interacciones; L = Estirpe Lampiña; T = Estirpe Torbiscal; R = Estirpe Retinta; CC = Acabado convencional (dieta a base de concentrado); CM = acabado en montanera (dieta a base de bellotas); RMSE = Raíz del error cuadrático medio; Gen. = Genotipo; S.A. = Sistema de alimentación; P. nobles = Piezas nobles (jamón + paleta + lomo); GIM = Porcentaje de grasa intramuscular obtenida del lomo a la altura de la 10ª costilla; * = P-valor menor de 0,10. ** = P-valor menor de 0,05. Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

Perfil lipídico de la grasa subcutánea

Los resultados relacionados con los ácidos grasos se presentan en la **Tabla 11**. La estirpe Lampiña obtuvo el mayor porcentaje de C16:0, C17:0, C17:1, C18:2, SFA y PUFA, los mayores índices aterogénicos (IA) y trombogénicos (IT), además del menor porcentaje de C20:0, C18:1 y MUFA. El Retinto, por su parte, presentó mayores porcentajes de C18:1 y MUFA, un menor porcentaje de SFA y una menor relación n6/n3. El Torbiscal mostró el mayor contenido de C20:1 y el menor de C14:0, C16:1 y C18:3. Estos resultados indican grandes diferencias en el perfil de ácidos grasos entre los tres genotipos, lo cual es llamativo, ya que los estas tres estirpes pertenecen al tronco Ibérico, y en general se suponía que todas la estirpes Ibéricas tenían perfiles de ácidos grasos similares.

En relación con los sistemas de acabado (**Tabla 11**), los cerdos de montanera tuvieron unas proporciones significativamente mayores de C18:0, C18:1, C18:2, MUFA y PUFA que los de cebo de campo. Sin embargo, los cerdos de cebo depositaron más SFA que los de montanera, con la excepción de C12:0. En consecuencia, la proporción de SFA y los índices IA, IT y n6/n3 fueron mayores en los cerdos de cebo que en los de montanera, lo que hace que este último sistema produzca una carne de cerdo más saludable que el otro sistema, basado en el uso de piensos.

En cuanto a los efectos de interacción (**Tabla 11**), la deposición de C17:0 y C17:1 fue mayor para los cerdos de cebo, e incluso mucho más para los Lampiños. Este último genotipo tuvo otra interacción (también de gran magnitud) para el ácido graso C18:2, pero en este caso, en contraste, su deposición fue considerablemente mayor en el sistema de montanera. Por último, la relación n6/n3 tuvo también una interacción genotipo x sistema, con unos valores de dicho índice mayores para el genotipo Torbiscal y para el sistema de cebo.

Tabla 11. Efecto del genotipo y el sistema de alimentación en los perfiles de ácidos grasos (%) y sus ratios.

Carácter	Genotipo			Sistema acabado			P-Valor		
	L	T	R	CC	CM	RMSE	Gen.	F.S.	Int
C12:0	0,054	0,052	0,054	0,054	0,053	0,005	0,1507	0,3542	NS
C14:0	1,200	1,136 ^a	1,196	1,197 ^a	1,158	0,079	0,0141	0,0485	NS
C16:0	21,670 ^a	20,740	20,262	21,688 ^a	20,094	0,916	<,0001	<,0001	NS
C16:1	1,449	1,224 ^a	1,435	1,511 ^a	1,227	0,211	0,001	<,0001	NS
C17:0	0,431 ^a	0,325	0,341	0,425 ^a	0,307	0,048	<,0001	<,0001	**
C17:1	0,488 ^a	0,422	0,413	0,516 ^a	0,366	0,079	0,006	<,0001	**
C18:0	11,041 ^a	10,805 ^{ab}	10,490 ^b	11,542 ^a	10,015	0,614	0,085	<,0001	*
C18:1	49,908 ^c	51,763 ^b	52,585 ^a	49,991	52,846 ^a	1,964	<,0001	<,0001	NS
C18:2	10,509 ^a	10,128	9,889	9,875	10,476 ^a	0,217	0,000	<,0001	**
C18:3	1,235	1,161 ^a	1,228	0,972	1,444 ^a	0,017	0,129	<,0001	NS
C20:0	1,340 ^a	1,499	1,450	1,501 ^a	1,359	0,140	0,0018	0,0001	NS
C20:1	0,674	0,713 ^a	0,665	0,717 ^a	0,651	0,060	0,025	<,0001	NS
SFA	35,738 ^a	34,569 ^b	33,783 ^c	36,420 ^a	32,974	2,281	0,001	<,0001	NS
MUFA	52,519 ^c	54,142 ^b	55,100 ^a	52,734	55,107 ^a	2,202	<,0001	<,0001	NS
PUFA	11,744 ^a	11,289	11,116	10,847	11,919 ^a	0,294	0,001	<,0001	*
IA	0,414 ^a	0,388	0,380	0,418 ^a	0,370	0,025	0,0001	<,0001	NS
IT	0,964 ^a	0,918	0,885	1,004 ^a	0,841	0,066	0,001	<,0001	NS
Ratio n6/n3	8,869	9,123	8,332 ^a	10,237 ^a	7,312	0,531	0,003	<,0001	**

L = Estirpe Lampiña; T = Estirpe Torbiscal; R = Estirpe Retinta; CC = Acabado convencional (dieta a base de concentrado); CM = acabado en *montanera* (dieta a base de bellotas); RMSE = Raíz del error cuadrático medio; Gen. = Genotipo; S.A. = Sistema de alimentación; SFA = Ácidos grasos saturados; MUFA = Ácidos grasos monoinsaturados; PUFA = Ácidos grasos poliinsaturados; AI = Índice aterogénico; TI = Índice trombogénico; Ratio 6/3 = n6/n3; ratio obtenido al dividir los ácidos grasos Omega 6 entre los Omega 3; * = P-valor menor de 0,10; ** = P-valor menor de 0,05. Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

Continuando con las interacciones genotipo x sistema, entre los ácidos grasos más importantes que presentaron una interacción significativa, en las 3 Figuras siguientes se representan las interacciones del ácido esteárico, del linoleico y de los PUFA. En la **Figura 34**, se observa que para el ácido esteárico las diferencias entre el sistema de cebo y el de *montanera* fueron más pequeñas para la estirpe R que para las otras dos. No hay diferencias significativas entre ninguna estirpe en el sistema de *montanera*, pero sin embargo en el sistema de cebo la estirpe L depositó más esteárico que la R.

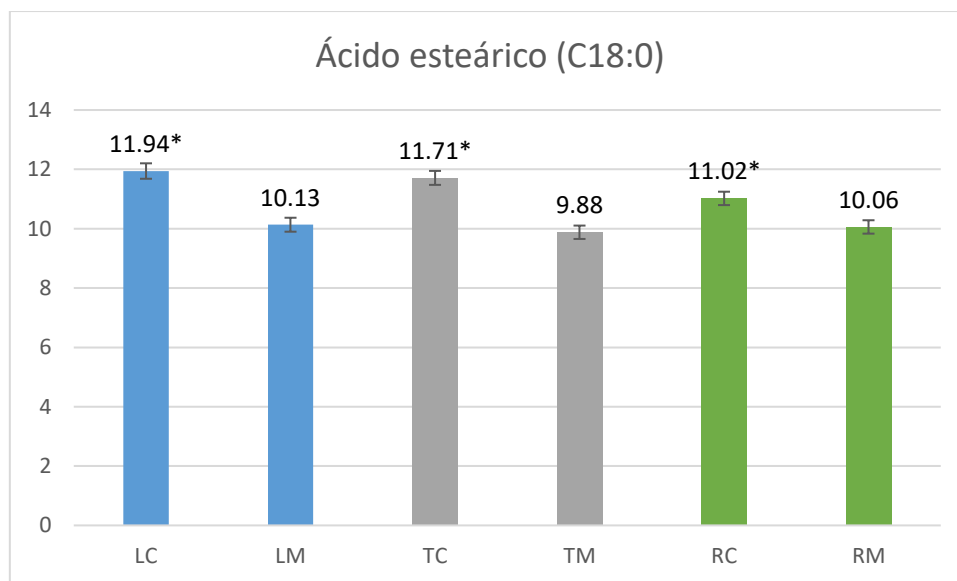


Figura 34. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema del perfil de ácido esteárico (%) (C18:0). L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

En relación al ácido linoleico (**Figura 35**), su proporción fue igual en los Torbiscuales de cebo que en los de montanera, pero sin embargo para las estirpes L y R hubo más linoleico en la grasa de los animales de montanera que en los de cebo, siendo estas diferencias mayores en los Lampiños, es decir, que esta última estirpe es la que depositó más cantidad de ácido linoleico en montanera.

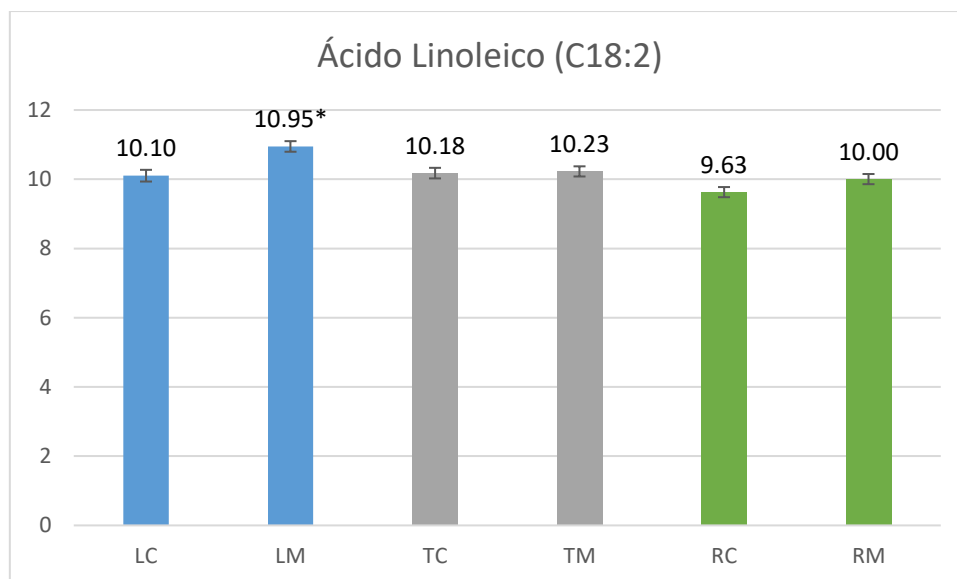


Figura 35. Gráfica de las interacciones genotipo x sistema del perfil de ácido linoleico (%) (C18:2). L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

Las interacciones de los PUFA, representadas en la **Figura 36**, presentan la misma tendencia que las del ácido linoleico, que es ácido poliinsaturado mayoritario. Así, se observa que en las tres estirpes hubo más PUFA en la grasa de los animales de montanera que en los de cebo, y que esas diferencias fueron mayores en la estirpe Lampiña, que además depositó una mayor proporción de PUFA que los otros grupos en montanera.

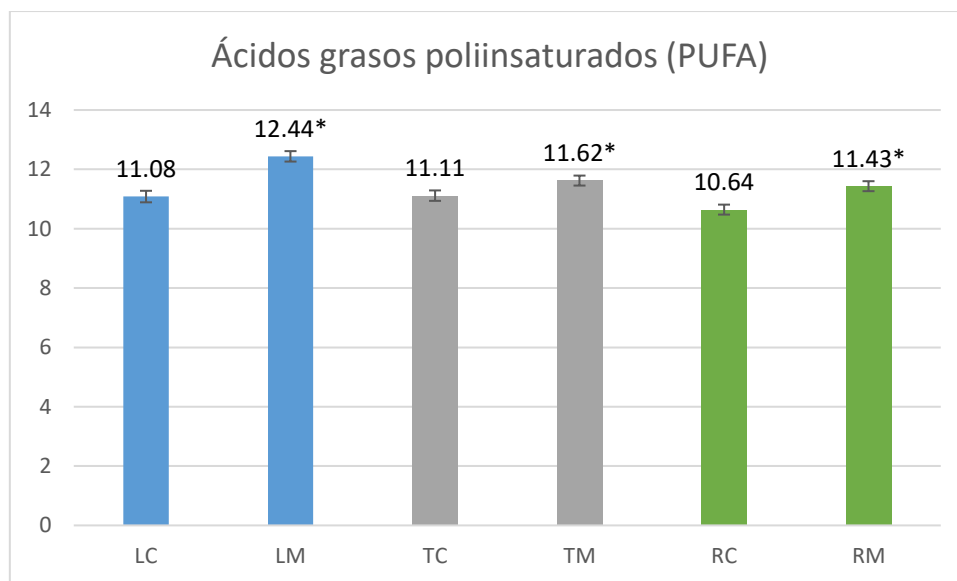


Figura 36. Gráfica de las interacciones del perfil de ácidos poliinsaturados (%) (PUFA). L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico

La **Tabla 12** muestra los valores obtenidos y normalizados de la qPCR de los genes estudiados (SCD, ME1, ACACA, FASN, EGR1, ACOX1 y ACLY) en los tres genotipos y los dos sistemas de alimentación. Hubo un efecto del genotipo, marcado y significativo, para la expresión del gen SCD, que fue mayor (casi el doble) en R que en los otros genotipos. Este resultado puede explicar el contenido significativamente mayor de MUFA en R (según se indicó anteriormente) en comparación con los otros genotipos, que mostraron valores de expresión de SCD más bajos. La expresión del gen ME1 fue significativamente mayor para el genotipo L que para el T, teniendo R valores intermedios. El gen FASN se expresó significativamente más en Retinto, y aunque este gen regula la síntesis del ácido palmítico y de los SFA de cadena larga, esta estirpe mostró los valores más bajos de SFA, posiblemente debido a su mayor expresión del gen SCD. El gen ACLY también tuvo mayores valores de expresión en esta estirpe. Dado que el gen ACLY está implicado en la biosíntesis de ácidos grasos en general, parece razonable que la estirpe R tuviera los valores de expresión más altos, ya que esta estirpe mostró la mayor deposición de grasa subcutánea e intramuscular. Con

respecto a la expresión de los genes ACACA, EGR1 y ACOX1, en cambio, no se encontraron diferencias significativas entre los tres genotipos.

En relación con el efecto del sistema de alimentación (**Tabla 12**), todos los genes excepto SCD y EGR1, estuvieron significativamente sobre-expresados en los cerdos de cebo de campo. También hubo interacciones genotipo x sistema en la expresión de tres genes: ACACA ($P>0,004$), FASN ($P>0,03$) y ACLY ($P>0,0001$).

Tabla 12. Medias mínimo-cuadráticas de la expresión de los genes estudiados por genotipo y Sistema de alimentación y sus interacciones.

Carácter	Genotipo			S.A.			P-Valor		
	L	T	R	CC	CM	RMSE	Gen.	S.A.	Int
SCD	0,267	0,268	0,559 ^a	0,347	0,382	0,027	<,0001	0,412	NS
ME1	0,570 ^a	0,466 ^b	0,510 ^{ab}	0,558 ^a	0,472	0,010	0,008	0,001	NS
ACACA	0,395	0,436	0,447	0,463 ^a	0,389	0,013	0,335	0,012	**
FASN	0,089	0,118	0,337 ^a	0,243 ^a	0,119	0,025	<,0001	0,002	**
EGR1	0,169	0,176	0,260	0,239	0,164	0,040	0,255	0,133	NS
ACOX	0,645	0,684	0,650	0,697 ^a	0,622	0,010	0,390	0,004	NS
ACLY	0,305	0,336	0,430 ^a	0,422 ^a	0,292	0,005	<,0001	<,0001	**

L = Estirpe Lampiña; T = Estirpe Torbiscal; R = Estirpe Retinta; CC = Acabado convencional (dieta a base de concentrado); CM = acabado en montanera (dieta a base de bellotas); RMSE = Raíz del Error cuadrático medio; Gen. = Genotipo; S.A. = Sistema de alimentación; * = P-valor menor de 0,10; ** = P-valor menor de 0,05. Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

Las interacciones entre genotipo y sistema de alimentación para los genes ACACA y FASN se representan en la **Figura 37** y **Figura 38**. Hubo una significativa diferencia de expresión entre los Retintos de cebo y montanera, con sobre-expresión en los primeros, mientras que no hubo diferencias significativas para las otras dos estirpes entre los sistemas de cebo y montanera. Respecto al gen ACLY (**Figura 39**), sí que hubo diferencias de expresión entre el cebo y la montanera en las tres estirpes, pero de nuevo las diferencias de expresión entre sistemas fueron mucho mayores en el Retinto.

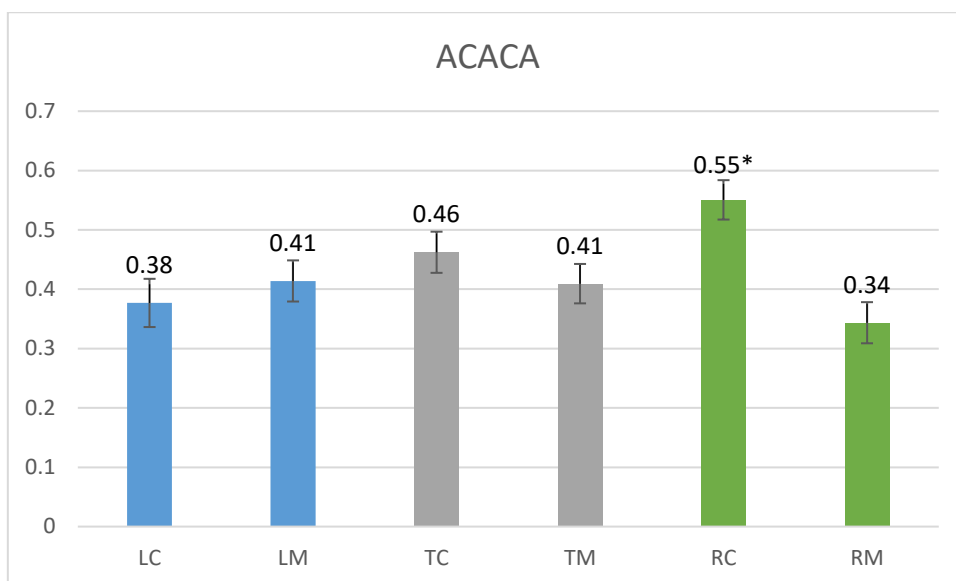


Figura 37. Gráfico de la interacción genotipo x sistema del gen ACACA L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

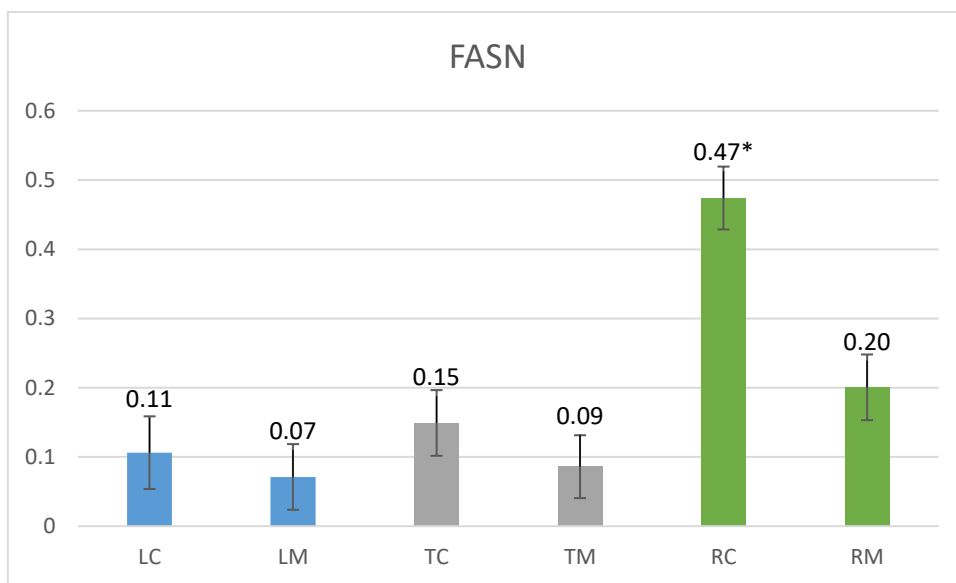


Figura 38. Gráfico de la interacción genotipo x sistema del gen FASN L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

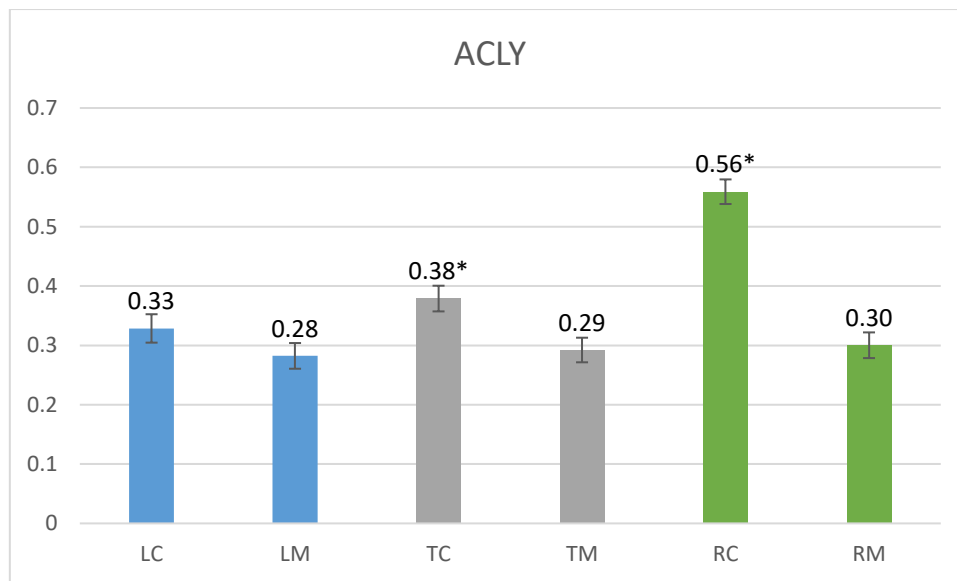


Figura 39. Gráfico de la interacción genotipo x sistema del gen ACLY L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto; C = cebo de campo; M = montanera.

4.2. Resultados del Experimento 2

4.2.1. Caracteres de canal, calidad de carne y parámetros metabólicos sanguíneos

La comparación de los tres genotipos del estudio del transcriptoma para los caracteres de la canal, los parámetros metabólicos y la calidad de carne se presenta en la **Tabla 13** y la **Tabla 14**. Como ya se ha mencionado anteriormente, estas estirpes presentan diferencias de tamaño, lo que las hace diferentes para algunos caracteres morfométricos (pesos y alturas principalmente). Sin embargo, en el momento del sacrificio, las tres estirpes presentaban el mismo grado de madurez y aproximadamente la misma edad, por lo que otras muchas diferencias están plausiblemente asociadas a causas genéticas y metabólicas. En consecuencia, se ha decidido ajustar varios de los análisis estadísticos por el peso del animal para evitar errores derivados de estas diferencias morfométricas.

Según lo indicado en la **Tabla 13**, la estirpe Lampiña es la más pequeña, la Torbiscal la más grande y la Retinta la intermedia. En cuanto a los caracteres de crecimiento y de canal, la Lampiña es la estirpe con menor peso de sacrificio, ganancia media diaria (**GMD**), peso de canal y espesor de grasa dorsal interna. Sin embargo, es la que tiene mayor rendimiento de jamón, además de no presentar diferencias significativas en los rendimientos de paleta y lomo con respecto a las otras estirpes, a pesar de su aparentemente menor robustez, tal vez sugerida por su menor tamaño. Como se indicó anteriormente, la estirpe Torbiscal es la que presentó los mayores rendimientos de canal y jamón y el mayor espesor de grasa dorsal externa, y el Retinto presentó valores intermedios.

En relación al metabolismo (**Tabla 13**), la estirpe Retinta es también la que presentó los valores más altos en ALT/GPT, HDL, colesterol y triglicéridos, y los menores valores de creatinina, mientras que la Lampiña tuvo los valores más altos de urea.

En relación con la calidad de la carne (**Tabla 14**), el Retinto resultó tener la carne de un color más rojizo (valor a^*) y la Lampiña tuvo los menores valores en L^* , a^* y b^* . En relación con el pH, la humedad y la capacidad de retención de agua, no hubo diferencias significativas entre las estirpes. Lampiño tuvo los mayores porcentajes de SFA y menores porcentajes de oleico, MUFA y PUFA que las otras estirpes, siendo T y R similares en cuanto a la deposición de ácidos grasos.

Tabla 13. Medias mínimo cuadráticas de los caracteres de canal y parámetros metabólicos sanguíneos

Medias por genotipo						
Caracter	unidad	L	T	R	RMSE	P-valor
Pesos y medidas de la canal – ajustado con peso canal si “*”						
PS	kg	149,750 ^a	166,667	168,083	8,138	0,002
GMDA*	kg	0,462	0,483	0,530	0,049	0,166
LC*	cm	88,314	90,336 ^a	88,568	1,309	0,059
PC	kg	117,280 ^a	131,017	132,133	7,378	0,009
RC	%	0,789	0,786	0,786	0,001	0,970
LJ*	cm	59,042	63,724 ^a	60,408	1,866	0,007
PJ*	cm	77,188	76,470	74,706	2,153	0,273
RJ	%	0,206 ^a	0,177	0,187	0,014	0,014
RP	%	0,115	0,119	0,114	0,005	0,321
RL	%	0,027	0,028	0,025	0,003	0,125
Caracteres ultrasónicos						
EGLU	cm	5,941	5,760	5,926	0,562	0,866
GDI	cm	1,840 ^a	2,265	2,371	0,271	0,119
GDM	cm	4,146	4,248	4,218	0,328	0,934
GDE	cm	1,475	2,045 ^a	1,584	0,309	0,033
GDT	cm	7,461 ^a	8,559 ^b	8,173 ^{ab}	0,530	0,076
ACH	cm ²	20,507	20,536	21,685	1,986	0,671
Parámetros sanguíneos						
ALTGPT	mg/dl	67,375	59,913	79,090 ^a	9,008	0,008
HDL	mg/dl	62,118	59,480	82,123 ^a	7,140	0,000
LDL	mg/dl	53,982	55,567	51,223	8,193	0,657
chol	mg/dl	129,693	132,093	153,497 ^a	12,846	0,011
crea	mg/dl	1,213	1,157	1,085 ^a	0,058	0,006
glu	mg/dl	68,860	73,702	71,833	7,584	0,550
FE	mg/dl	120,582	129,677	123,552	25,879	0,827
PT	mg/dl	74,602	76,848	76,883	2,300	0,178
trig	mg/dl	47,418	51,588	80,783 ^a	19,318	0,018
urea	mg/dl	34,613 ^a	25,900	26,180	3,526	0,001

L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto, RMSE = Raíz del error cuadrático medio; PS= Peso sacrificio; GMDA= Ganancia media diaria durante el acabado; PC = Peso de la canal; LC = Longitud de la canal; RC = Rendimiento de la canal; LJ = Longitud del jamón; PJ = Perímetro del jamón; RJ = Rendimiento del jamón; RP = Rendimiento de la paleta; RL = Rendimiento del lomo; EGLU= Espesor del músculo glúteo; ACHU = Área del lomo; GDI = Capa subcutánea interna de la grasa dorsal a la altura de la 10ª costilla; GDM = Capa subcutánea media de la grasa dorsal a la altura de la 10ª costilla; GDE = Capa subcutánea externa de la grasa dorsal a la altura de la 10ª costilla; GDT = Capa subcutánea completa de la grasa dorsal a la altura de la 10ª costilla; PT = proteínas totales; FE = hierro; chol= colesterol; crea = creatinina; glu = glucosa; Tryg= Triglicéridos; Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

Tabla 14. Medias mínimo cuadráticas de los caracteres de calidad de la carne

<i>Medias por genotipo</i>						
Caracter	unidad	L	T	R	RMSE	P-valor
Caracteres de calidad de carne – Ajustado por peso canal si “♦”						
GIM♦	%	2,814	4,722	4,398	1,446	0,274
SFA	%	34,272 ^a	31,444	32,415	1,766	0,041
MUFA	%	54,899 ^a	57,442 ^b	56,453 ^{ab}	1,546	0,037
PUFA	%	10,850	11,114	11,132	0,628	0,692
C12	%	0,078	0,069	0,070	0,077	0,128
C14	%	1,444 ^a	1,260 ^b	1,363 ^{ab}	0,110	0,037
C16	%	21,290 ^a	19,613	20,171	0,790	0,007
C16:1	%	2,159	1,790	1,984	0,317	0,166
C17	%	0,393	0,309	0,338	0,065	0,115
C17:1	%	0,303 ^a	0,257	0,261	0,037	0,093
C18	%	10,954	10,042	10,326	1,316	0,487
C18:1	%	51,159 ^a	53,575	52,742	1,287	0,017
C18:2	%	9,836	10,216	10,112	0,535	0,464
C18:3	%	1,014	0,897	1,020	0,148	0,301
C20	%	0,114 ^a	0,149	0,148	0,019	0,006
C20:1	%	1,278 ^a	1,821 ^b	1,466 ^c	0,173	0,000
L*		43,514 ^a	50,502 ^b	47,888 ^{ab}	3,132	0,039
a*		7,901 ^a	10,829 ^b	12,682 ^c	1,027	0,000
b*		3,845 ^a	6,778	6,771	0,980	0,005
WB♦		3,021	3,217	3,247	0,757	0,931
pH 45'♦	pH	6,433	6,335	6,289	0,202	0,683
pH 24h♦	pH	5,858	5,797	5,739	0,111	0,405

L= Lampiño; T = Torbiscal; R = Retinto, RMSE = Raíz del error cuadrático medio GIM = Porcentaje de grasa intramuscular; SFA = Ácidos grasos saturados; MUFA = Ácidos grasos monoinsaturados; PUFA = Ácidos grasos poliinsaturados; WB = Warner-Bratzler test para la textura. Entre las columnas de genotipos y de Sistema de alimentación, los valores con distintas letras en el superíndice indican diferencias con P-valor < 0,05.

4.2.2. Estudio del transcriptoma en el músculo *Longissimus dorsi*

Con la técnica de RNA-seq, se detectaron un total de 17.273, 17.194 y 17.272 genes expresados para L vs T, L vs R y T vs R respectivamente (en adelante abreviados como LvsT, LvsR y TvsR, respectivamente). Después, tras el filtrado informático, se detectaron los genes diferencialmente expresados (DEG) para las comparaciones siguientes: en LvsT, se encontraron 272 DEGs, 188 con la regulación aumentada y 88 con la regulación reducida en L. En LvsR, se encontraron 676 DEGs, 366 con más regulación y 310 con menos regulación en L, y finalmente, en TvsR se encontraron 125 DEGs, 99 más regulados y 35 menos regulados en T (**Figura 40**). No hubo ningún DEGs en común entre las tres comparaciones. Sin embargo, LvsT tuvo 101 DEGs en común con LvsR, y 9 en común con TvsR, y LvsR tuvo 44 DEG en común con TvsR (**Figura 41**). Una lista de los DEGs más relevantes se muestra en la **Tabla 15**.

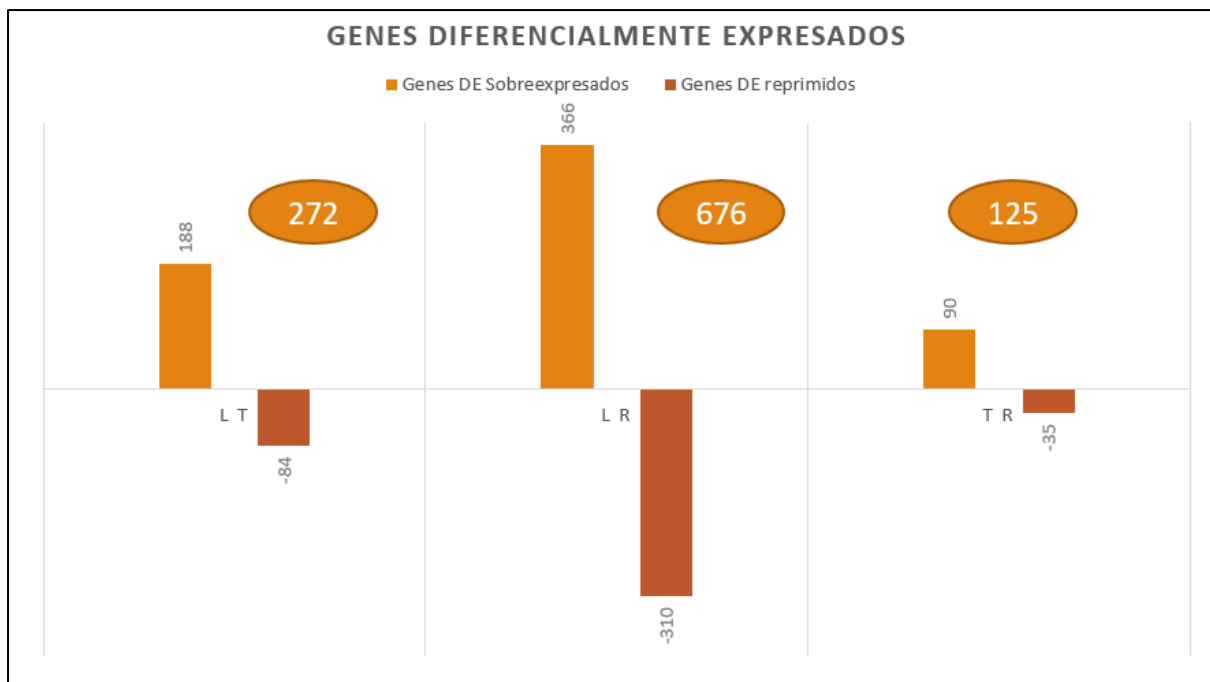


Figura 40. Genes diferencialmente expresados (DE) en cada comparación L = Lampiño, T = Torbiscal, R = Retinto

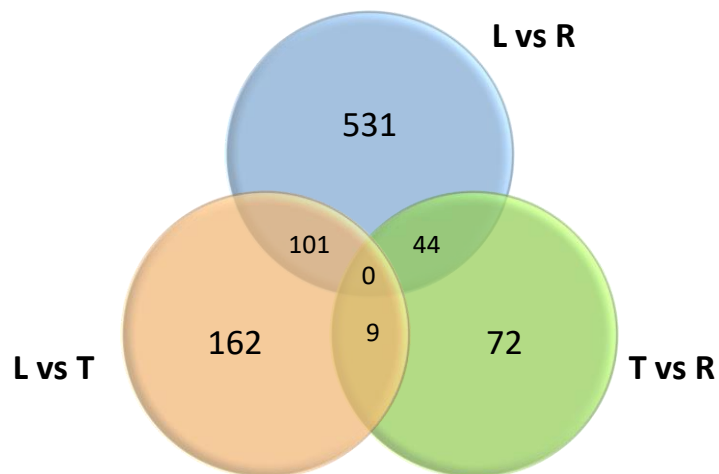


Figura 41. Genes diferencialmente expresados comunes y no comunes en cada comparación R = Retinto, L = Lampiño, T = Torbiscal.

Tabla 15. Principales genes diferencialmente expresados mencionados en el presente estudio

Gen	Lampiño vs Torbiscal			Lampiño vs Retinto			Torbiscal vs Retinto		
	FC	P-valor	P-adj	FC	P-valor	P-adj	FC	P-valor	P-adj
COL3A1	0,94	0,000	0,016	0,64	0,010	0,07	-	-	-
COL7A1	0,90	0,001	0,046	-	-	-	-	-	-
SHROOM1	2,40	0,000	0,000	2,01	0,000	0,00	-	-	-
ARRB1	0,72	0,002	0,070	0,96	0,000	0,01	-	-	-
EPHA1	0,61	0,002	0,090	0,67	0,001	0,02	-	-	-
MYH1	-	-	-	-	-	-	0,65	4,9E-05	5E-03
MYH2	-	-	-	-	-	-	0,65	4,9E-05	5E-03
MYH3	-	-	-	-0,81	0,001	0,02	-	-	-
MYH4	-	-	-	-	-	-	0,65	4,9E-05	5E-03
ACTA1	-	-	-	0,71	0,000	0,02	0,66	1,2E-03	4E-02
TNNI2	-	-	-	0,67	0,001	0,02	0,67	5,2E-04	2E-02
FABP4	0,90	0,001	0,074	0,68	0,010	0,09	-	-	-
SCARB1	-	-	-	0,72	0,001	0,03	-	-	-
APOA1	-	-	-	0,71	0,008	0,09	-	-	-
ALDH4A1	-0,66	0,000	0,008	-0,70	0,000	0,00	-	-	-
FADS2	-	-	-	0,96	0,001	0,04	-	-	-
VEGFA	0,66	0,002	0,048	-	-	-	-0,65	1,7E-03	4E-02
EBF2	0,62	0,002	0,060	-	-	-	-	-	-
LAMA4	0,80	0,000	0,027	0,75	0,000	0,02	-	-	-
SOX8	-	-	-	0,84	0,002	0,06	-	-	-

FC= Log²Fold Change; “-“: No diferencialmente expresados.

Los resultados de los análisis funcionales de Gene Ontology (GO), realizados con el software FatiGO para las tres comparaciones, se describen en la **Tabla 16**. En la comparación LvsT, se identificaron 497 rutas de *procesos biológicos GO* (GObp), 1 función molecular y 11 GOslim GOA. En la comparación LvsR, se detectaron 1070 rutas GObp, 13 GOslim GOA, 14 InterPro, 1 *GO Componente Celular* y 2 de *Función Molecular*. Por último, en la comparación TvsR, se detectaron 26 rutas GObp, 3 GOslim GOA y 4 InterPro.

Tabla 16. Análisis Fatigo: rutas GO_{cc}, GO_{bp} e InterPro principales

	Rutas	Genes	Adj pvalor
Lampiño vs Torbiscal			
GO _{bp}	collagen fibril organization (GO:0030199)	ANXA2,SFRP2,COL3A1,COL5A2,LUM,SERPINH1,LOXL2	3,95E-08
	fat cell differentiation (GO:0045444)	EBF2,CCND1,SFRP2,FABP4,BBS2,SH2B2,GPX1,ZNF385A,LAMA4	9,37E-07
	collagen catabolic process (GO:0030574)	COL3A1,COL5A2,COL7A1,COL6A3,COL8A1,COL16A1,COL15A1	2,21E-06
	brown fat cell differentiation (GO:0050873)	EBF2,FABP4,SH2B2,LAMA4	9,75E-05
	actin filament bundle assembly (GO:0051017)	PHACTR1,S100A10,ARRB1,SHROOM1,EPHA1	1,61E-03
	neutral lipid metabolic process (GO:0006638)	FABP4,GPX1,LPIN2,LDLR	1,57E-02
	cellular lipid catabolic process (GO:0044242)	PLA2G4E,FABP4,ACOXL,LDLR	2,50E-02
InterPro	Collagen (IPR008160)	COL3A1,COL5A2,COL7A1,COL6A3,COL8A1,COL28A1,COL16A1,COL15A1	1,35E-05
Lampiño vs Retinto			
GO _{bp}	actin filament bundle assembly (GO:0051017)	SORBS1,WNT4,ARRB1,SHROOM1,EPHA1,GAS7,EZR,EVL,APOA1,TPM1,AIF1,FSCN2,LCP1	1,64E-09
	striated muscle cell differentiation (GO:0051146)	HACD1,CHUK,MYH3,UCHL1,MYH11,SORT1,CAV3,SOX8,CAMK2D,TPM1,TDGF1,SMYD1,RBM24,HRAS,ACTA1	1,63E-08
	regulation of muscle system process (GO:0090257)	ADRB2,MYL9,CNN1,CAV3,CAMK2D,AKAP13,PPP1R12B,TPM1,ANK2,AIF1,MAP2K1,PKP2,TNNI2,TNNC2	3,91E-08
	muscle cell development (GO:0055001)	MYH3,UCHL1,MYH11,CAV3,SOX8,CAMK2D,RAMP2,TPM1,ANK2,SMYD1,ACTA1	1,32E-06
	fat cell differentiation (GO:0045444)	ADRB2,CCND1,SFRP2,FABP4,CCDC85B,SOX8,ALDH6A1,SH2B2,ARL6,FOXO1,LAMA4	2,62E-06
	collagen metabolic process (GO:0032963)	MRC2,WNT4,CTSS,MFAP4,COL3A1,SERPINH1,COL18A1,COL17A1,COL15A1	9,99E-06
	collagen catabolic process (GO:0030574)	MRC2,CTSS,COL3A1,COL18A1,COL17A1,COL15A1	7,07E-04
	positive regulation of lipid metabolic process (GO:0045834)	SORBS1,WNT4,VAV2,PPARA,SCARB1,APOA1	2,43E-03
	lipid homeostasis (GO:0055088)	FABP4,CAV3,SCARB1,APOA1,PKP2	9,10E-03
	cholesterol import (GO:0070508)	SCARB1,APOA1	1,00E-02
	lipid storage (GO:0019915)	NRIP1,PPARA,SCARB1,APOA1	1,20E-02
	cholesterol homeostasis (GO:0042632)	FABP4,CAV3,SCARB1,APOA1	1,47E-02
	regulation of lipid metabolic process (GO:0019216)	SORBS1,WNT4,VAV2,PPARA,SCARB1,APOA1,BRCA1	1,60E-02
	triglyceride metabolic process(GO:0006641)	FABP4,CAV3,SCARB1,GPAT3,AGPAT3	2,12E-02
	neutral lipid metabolic process(GO:0006638)	FABP4,CAV3,SCARB1,GPAT3,AGPAT3	2,50E-02
	fatty acid biosynthetic process(GO:0006633)	HACD1,CBR4,FADS3,FADS2,BRCA1	3,82E-02
	cellular lipid catabolic process(GO:0044242)	HACL1,FABP4,SGPL1,PPARA,SCARB1	4,56E-02
	regulation of cholesterol storage(GO:0010885)	PPARA,SCARB1	4,91E-02
GO _{cc}	smooth muscle contractile fiber(GO:0030485)	MYH11,ACTA2	6,40E-03
InterPro	Collagen(IPR008160)	C1QL3,COL3A1,C1QC,C1QA,C1QB,C1QTNF7,COL18A1,COL17A1,COL15A1	3,85E-04
	Fatty_acid_desaturase-1(IPR005804)	DEGS2,FADS3,FADS2	1,40E-02
Torbiscal vs Retinto			
GO _{bp}	actin-myosin filament sliding(GO:0033275)	MYL1,MYH2,MYH4,TPM1,ACTA1,ACTC1,TNNI2,TNNC2,TNNT3	2,73E-14
	actin-mediated cell contraction(GO:0070252)	MYL1,MYH2,MYH4,TPM1,ACTA1,ACTC1,TNNI2,TNNC2,TNNT3	4,86E-13
	striated muscle contraction (GO:0006941)	MYL1,JSRP1,PGAM2,TPM1,ACTC1,TNNI2,TNNC2,TNNT3	9,56E-09
	striated muscle cell differentiation(GO:0051146)	VEGFA,SOX6,TPM1,HRAS,ACTA1,ACTC1	1,81E-04
	muscle cell development(GO:0055001)	VEGFA,TPM1,ACTA1,ACTC1	1,76E-02
InterPro	Myosin_N(IPR004009)	MYH1,MYH2,MYH4,MYH15	3,92E-05

GO_{bp} = Gene Ontology Procesos Biológicos; InterPro = Análisis Funcional de proteínas, clasificándolas en familias; GO_{cc} = Gene Ontology Componentes celulares.

También se realizó un análisis de rutas canónicas con estos DEGs para LvsT, LvsR y TvsR. Las rutas canónicas más importantes se representan en la **Tabla 17**. Resultaron varias rutas con valores de *z-score*. Este valor indica una diferencia en la regulación de la ruta entre los dos grupos que se comparan, en nuestro caso entre dos de las estirpes comparadas. En LvsT aparece una ruta canónica relacionada con la degradación del glucógeno y la oxidación de los ácidos grasos sin *z-score*; sin embargo, las rutas con la *z-score* más alta están relacionadas con la señalización de la fibrosis hepática con un valor positivo de 2,449 y la señalización de la sinaptogénesis con un valor positivo de 0,447, ambas activadas en la estirpe L. En la segunda comparación, LvsR, las rutas canónicas activadas que no tenían relación con enfermedades son “Señalización del Citoesqueleto de Actina”, “Interacciones de Agrina en la Unión Neuromuscular” y “Regulación de la Motilidad basada en Actina por Rho” con un *z-score* de 2,840, 1,633 y 2,449, respectivamente, activadas en L. También hay una ruta activada en R, en la comparación LvsR, con el nombre “Desarrollo de los Melanocitos y la Señalización de la Pigmentación”, con un *z-score* de -0,816. Finalmente, en la comparación TvsR la ruta más activada relacionada con este estudio es la de “Señalización del Citoesqueleto de Actina”, con un *z-score* de 1,633 activado en la estirpe T.

Tabla 17. Rutas canónicas principales obtenidas con el software IPA.

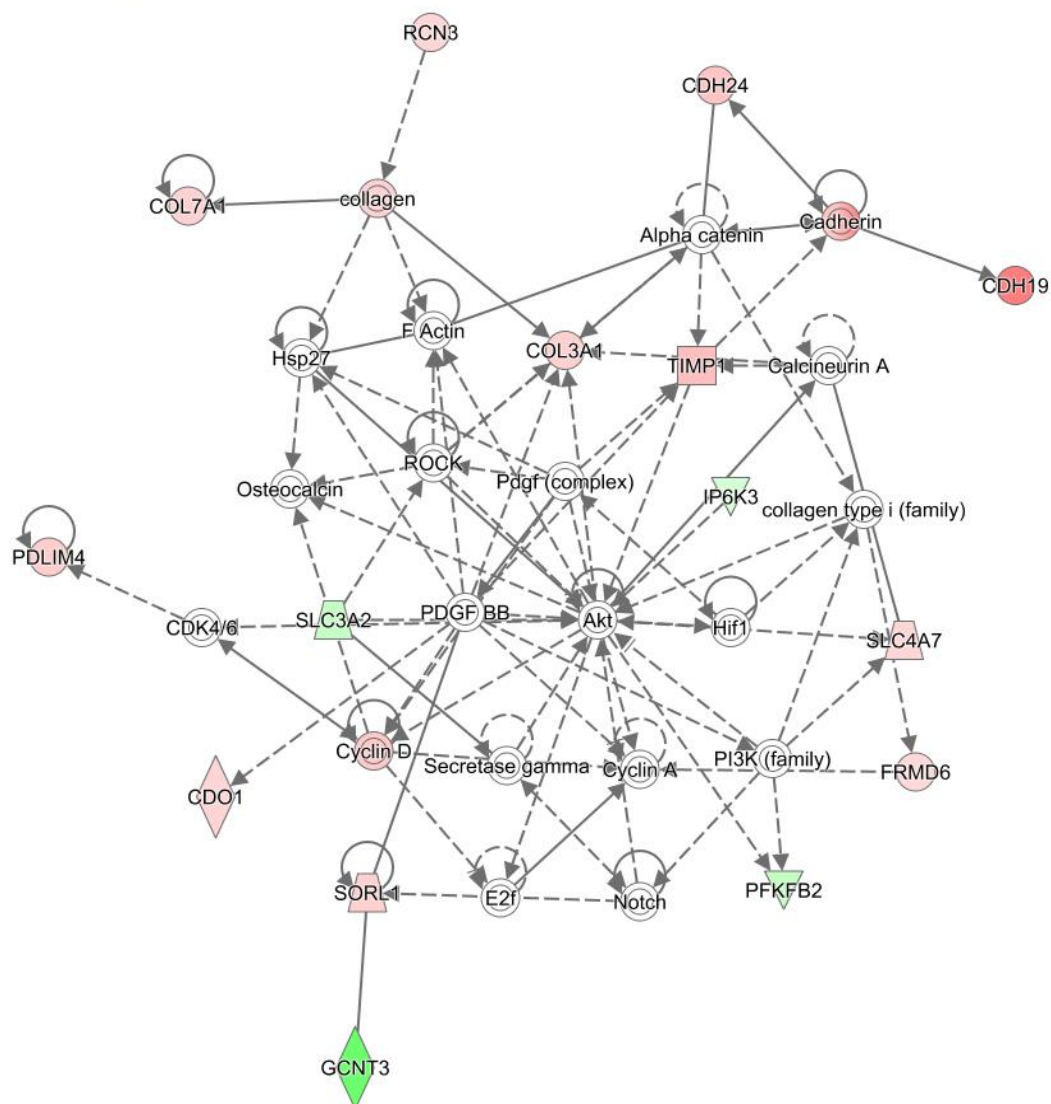
Rutas Canónicas	$-\log(p\text{-value})$	z-score	Genes
Lampião vs Torbiscal			
Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	1,78	2,449	CCND1,COL3A1,IL33,SP P1,TIMP1,VEGFA
Synaptogenesis Signaling Pathway	1,57	0,447	ADCY2,CDH19,CDH24, DLG4,NRXN1
Glycogen Degradation II	1,2	-	MTAP
Fatty Acid α -oxidation	0,987	-	ALDH4A1
Lampião vs Retinto			
Actin Cytoskeleton Signaling	4,74	2,840	ACTA1,ACTA2,ACTG2,A RPC1B,CD14,EZR,FLNA, HRAS,MAP2K1,MYH11, MYH13,MYH3,MYL9,NC KAP1L,PPP1R12B,TMSB 10/TMSB4X,VAV1,VAV 2
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	2,09	1,633	ACTA1,ACTA2,ACTG2,E RBB3,HRAS,MUSK
Melanocyte Development and Pigmentation Signaling	2,03	-0,816	ADCY1,ATF4,EP300,HR AS,MAP2K1,PRKAR2A,S H2B2
Glycolysis I	1,58	-	ENO3,GAPDH,PGAM2
Oleate Biosynthesis II (Animals)	1,39	-	ALDH6A1,FADS2
Regulation of Actin-based Motility by Rho	1,35	2,449	ACTA1,ACTA2,ACTG2,A RPC1B,MYL9,PPP1R12B ACTA1,ACTA2,ACTG2,A DRB2,ANK2,ARRB1,C4A /C4B,CAMK2D,CAV3,C NN1,KCNMA1,MAP2K1 ,MYH11,MYH13,MYH3, MYL9,PGAM2,PPP1R12 B,SORBS1,TNNC2,TNNI 2,TPCN2,TPM1,TPM2
Skeletal and Muscular System Development and Function (Muscle contraction)	3,74E-06	1,109	
Torbiscal vs Retinto			
Actin Cytoskeleton Signaling	4,15	1,633	ACTA1,ACTC1,MYH1,M YH2,MYH4,MYL1
Glycolysis I	2,54	-	ENO3,PGAM2
Skeletal and Muscular System Development and Function (Morphology of muscle)	2,19E-03	-	ACTA1,ACTC1,DUSP8, MYH1,MYH2,MYH4,UT RN,VEGFA

IPA= Ingenuity Pathway Analysis.

En la **Tabla 18** se describen otros análisis realizados con el software IPA que detectaron varias redes enriquecidas en DEG. El software IPA asigna una puntuación de red en relación con el tamaño de la red y el número de genes objetivo involucrados. Esta puntuación se estima como el logaritmo negativo del p-valor calculado por el test exacto de Fisher. En las figuras siguientes sólo se representa la red más relevante de cada comparación; de esta forma, hay una red relacionada con el crecimiento y la proliferación celular en la comparación LvsT (**Figura 42**), otra relacionada con el metabolismo de los lípidos en la comparación LvsR (**Figura 43**) y, finalmente, una implicada en el ensamblaje y la organización celular, así como en el desarrollo celular, esquelético y muscular, en TvsR (**Figura 44**).

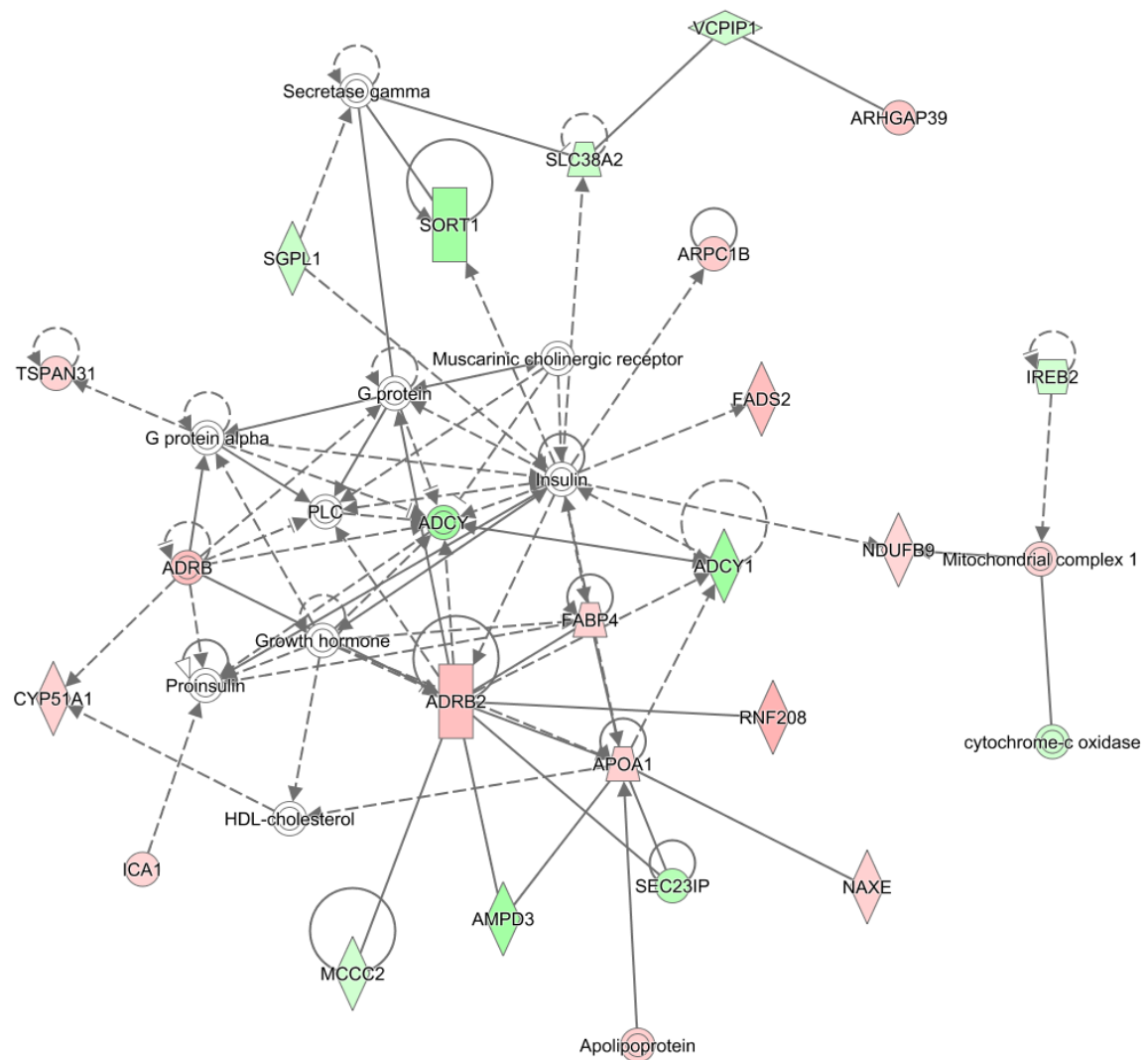
Tabla 18. Principales redes detectadas con el software IPA.

<i>Moléculas en la red</i>	<i>Puntuación</i>	<i>Moléculas del estudio</i>	<i>Funciones</i>
Lampiño vs Torbiscal			
Akt,Alpha catenin,Cadherin,Calcineurin A,CDH19,CDH24,CDK4/6,CDO1,COL3A1,COL7A1,collagen,collagen type i (family),Cyclin A,Cyclin D,E2f,F Actin,FRMD6,GCNT3,Hif1,Hsp27,IP6K3,Notch, Osteocalcin,Pdgf (complex),PDGF BB,PDLIM4,PFKFB2,PI3K (family),RCN3,ROCK,Secretase gamma,SLC3A2,SLC4A7,SORL1,TIMP1	27	15	Crecimiento y proliferación celular, Desórdenes del tejido conectivo, Desórdenes musculares y esqueléticos.
Lampiño vs Retinto			
ADCY,ADCY1,ADRB,ADRB2,AMPD3,APOA1,Apo lipoprotein,ARHGAP39,ARPC1B,CYP51A1,cytoc hrome-c oxidase,FABP4,FADS2,G protein,G protein alpha,Growth hormone,HDL-cholesterol,ICA1,Insulin,IREB2,MCCC2,Mitochondrial complex 1,Muscarinic cholinergic receptor,NAXE,NDUFB9,PLC,Proinsulin,RNF208,SEC23IP,Secretase gamma,SGPL1,SLC38A2,SORT1,TSPAN31,VCPIP1	28	21	Metabolismo lipídico, Transporte molecular, Bioquímica de moléculas pequeñas.
Torbiscal vs Retinto			
26s Proteasome,ACTA1,ACTC1,Actin,Alp,Calcineurin protein(s),caspase,CDK4,CTSF,Cyclin A,E2f,EREG,ERK26s Proteasome,ACTA1,ACTC1,Actin,Alp,Calcineurin protein(s),caspase,CDK4,CTSF,Cyclin A,E2f,EREG,ERK1/2,F Actin,FIS1,GDNF,Hsp90,JAM3,LIN7B,MCM6,MEF2,Mek,MTSS1,MYH1,MYH2,MYH4,MYL1,Myosin,OTUB1,Pdgf (complex),PDGF BB,PVALB,TPM1,UTRN,VEGFA	45	20	Ensamblaje y organización celular, Desarrollo celular, Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético.



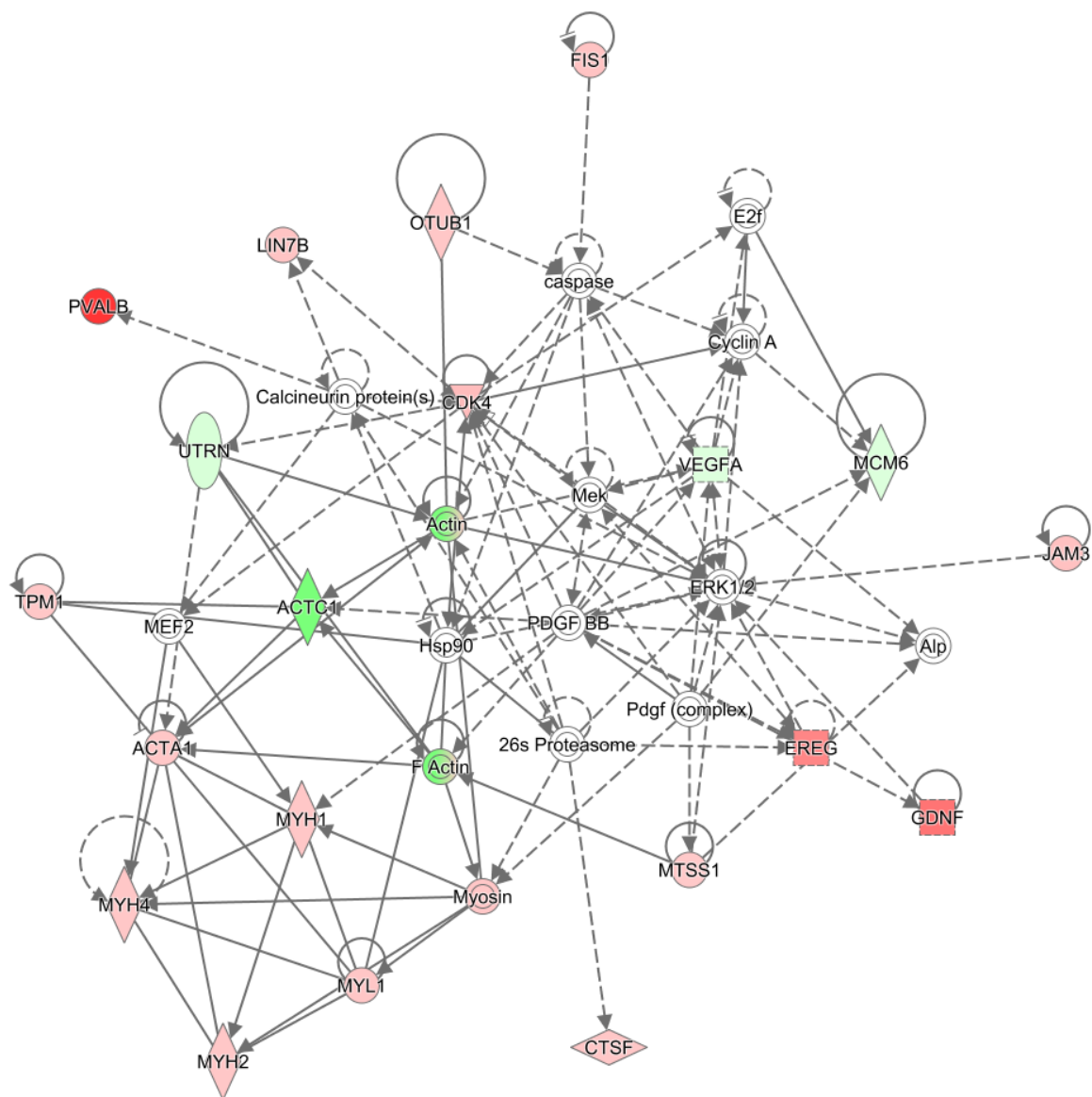
© 2000-2021 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 42. Red enriquecida presente en LvsT involucrada en "Crecimiento y proliferación celular, Desórdenes del tejido conectivo, Desórdenes musculares y esqueléticos.



© 2000-2021 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 43. Red enriquecida presente en LvsR involucrada en “Metabolismo lipídico, Transporte molecular, Bioquímica de moléculas pequeñas”.



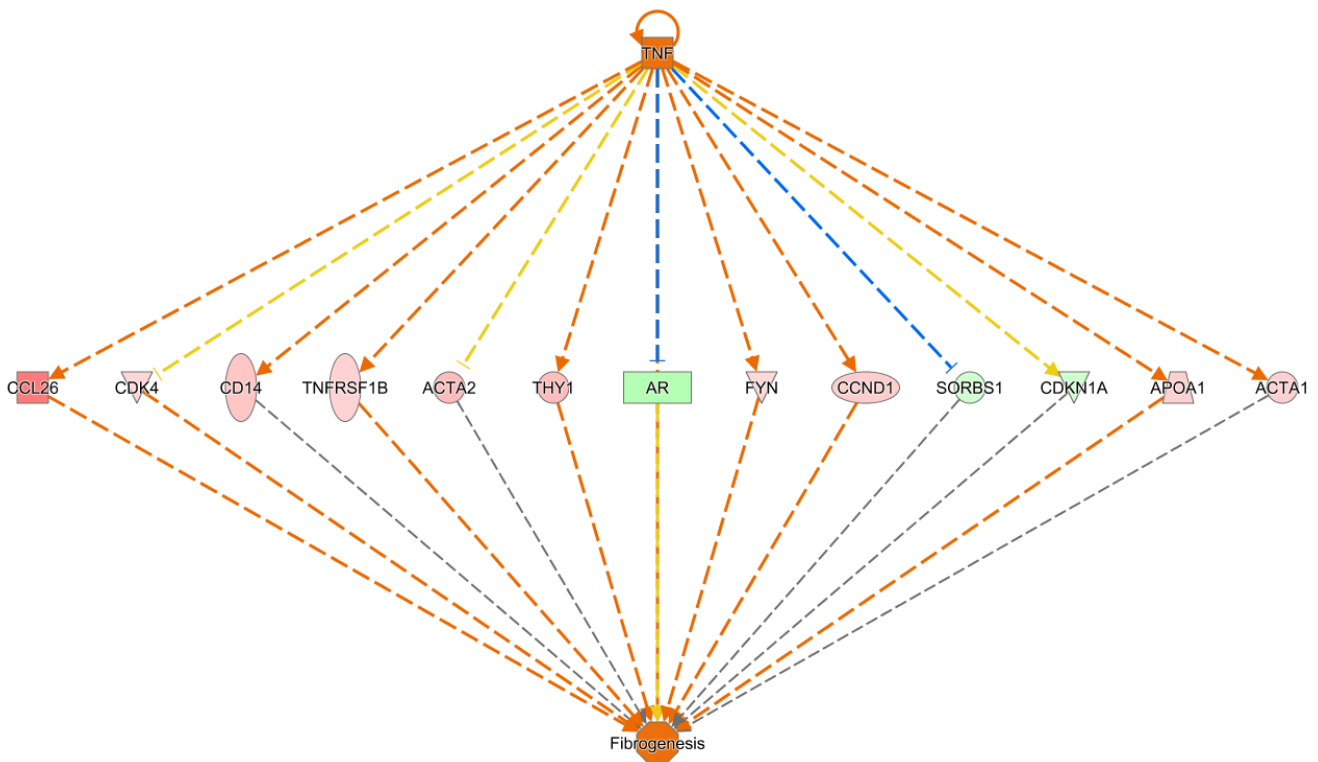
© 2000-2021 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 44. Red enriquecida presente en *TvsR* involucrada en "Ensamblaje y organización celular, Desarrollo celular, Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético".

Además, el análisis de reguladores “upstream” también se determinó con el software IPA. Esta herramienta determina los posibles factores reguladores en la transcripción de los genes problema implicados en un proceso molecular. Al igual que el otro análisis, esta prueba se realizó en las tres comparaciones y, tras filtrar por un p-valor $<0,05$, se encontraron 1.255 reguladores transcripcionales en la comparación LvsT, 1.349 reguladores transcripcionales en la LvsR y 590 en la TvsR. De todos estos resultados, se describe en la (**Tabla 19**) un regulador transcripcional interesante en LvsR, el TNF. Este regulador está implicado en la modulación de la fibrogénesis (**Figura 45**)

Tabla 19. TNF como regulador “upstream” por el análisis IPA en las comparaciones estudiadas.

TNF in IPA upstream regulators tool					
Regulador “Upstream”	Tipo Molecular	Activación prevista	Z-score	P-valor	Genes problema implicados
Lampião vs Torbiscal					
TNF	cytoquina	Activado	2,485	2,77E-08	ADORA2B,ANXA1,BMPER,C4A/C4B,CCL26,CCND1,CD209,CDO1,CLEC2D,COL3A1,CTSZ,CYBA,DCHS1,FRMD6,GASK1B,GDNF,GPX1,IFNAR2,IL33,LAMA4,MAP3K8,MT1A,PLP1,RCN3,S100A10,SLPI,SMURF1,SPP1,THY1,TIMP1,VEGFA
Lampião vs Retinto					
TNF	cytoquina	Activado	2,060	6,70E-05	ACTA1,ACTA2,ADGRG6,ADRB2,ALDH1A3,AMPD3,APOA1,AR,ARHGDIB,ASS1,ATF4,BGN,C4A/C4B,CCL26,CCND1,CD14,CDK4,CDKN1A,CDO1,CFD,CLEC2D,CNN1,COL15A1,COL3A1,COTL1,CTSF,CTSS,CTSZ,CX3CR1,CYBA,CYLD,DBT,DUSP1,EPHB2,FABP4,FOS,FOXO1,FOX P3,FST,FYN,GADD45G,GASK1B,GHR,GSMDM,HERC5,HIPK2,IFNAR2,IGFBP4,ILL10RA,IRF7,LAMA4,MCAM,MCM3,MGP,NFKB2,NFKBIE,NR1I2,NRIP1,PAFAH2,PPARA,RFTN1,RGL2,RRM2B,SCARB1,SGPL1,SLC15A3,SLC7A8,SLPI,SORB S1,SP1,TAGLN,THY1,TNFRSF1B,UBR2,VASH1,ZFP36
Torbiscal vs Retinto					
-	-	-	-	-	-



© 2000-2021 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 45. LvsR: Efecto regulador del TNF en la fibrogénesis.

Para una mejor comprensión, los resultados obtenidos se pueden clasificar en 4 grupos según la implicación de los DEGs en vías metabólicas similares: un grupo relacionado con el colágeno, un grupo de actina-miosina y desarrollo muscular y por último un grupo relacionado con el metabolismo lipídico. Estos tres grupos se describen a continuación.

4.2.2.1. Grupo del colágeno

En las comparaciones LvsT y LvsR se encontraron varias rutas relacionadas con la actividad del colágeno, sin embargo, en la comparación TvsR no hubo resultados importantes relacionados con el colágeno. De esto se puede deducir que la estirpe Lampiño es probablemente la responsable de las diferencias en el metabolismo del

colágeno, ya que estas rutas sólo se presentan cuando L está presente. De hecho, algunos de los resultados de la aplicación de base de datos *Fatigo* sobre procesos biológicos para LvsT son: collagen fibril organization (GO:0030199) y collagen catabolic process (GO:0030574). Además, también se detectó una ruta *interpro* llamada Collagen (IPR008160), tanto para LvsT como para LvsR. Algunos de los genes de estas rutas del colágeno, implicados en varias vías metabólicas en relación con esta proteína, son *COL3A1*, *COL5A2*, *COL18A1*, *COL17A1* y *COL15A1*, que se encargan de codificar diferentes fibras de colágeno alfa-1.

En el análisis de rutas canónicas del software de base de datos *IPA* no se encontraron vías específicas en relación con el metabolismo del colágeno. Sin embargo, el gen *COL3A1*, junto con el gen *VEGFA* (que codifica el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular, con las mismas siglas en inglés), está implicado en rutas relacionadas con la fibrosis hepática. En la comparación LvsT, una de estas vías canónicas, "Hepatic Fibrosis Signaling Pathway", está significativamente activada, con un *z-score* de 2.449. Aunque el *VEGFA* es un gen implicado en la vía de la fibrosis hepática, también está implicado en muchos otros procesos celulares, como la difusión de nutrientes y la angiogénesis (Villaplana-Velasco et al., 2021)

4.2.2.2. Grupo de desarrollo muscular

En las bases de datos génicas se han encontrado rutas relacionadas con el desarrollo muscular o la organización de la actina/miosina (**Tabla 16**) para las tres comparaciones de entre estirpes. Una de estas vías, la ruta de procesos biológicos denominada "Actin filament bundle assembly" (GO:0051017) está presente, aunque con un *p*-ajustado significativamente bajo, en las comparaciones LvsT y LvsR. En las comparaciones LvsR y TvsR se encontraron las rutas "Striated muscle cell differentiation" (GO:0051146) y "muscle cell development" (GO:0055001). También se pudo observar un gran número de otras rutas relacionadas con la actina/miosina en la comparación TvsR, entre ellas: "actin-myosin filament sliding" (GO:0033275), "actin-mediated cell contraction" (GO:0070252) o "striated muscle contraction"

(GO:0006941). También hay algunos resultados de la base de datos *InterPro* sobre genes implicados en el metabolismo de la miosina, como “*Myosin_N*” (IPR004009), “*Myosin tail*” (IPR002928) y “*Myosin head motor dom*” (IPR001609).

En la ruta de “*Actin filament bundle assembly*” (GO:0051017), hay varios genes en común para LvsT y LvsR, en particular: *SHROOM1*, *ARRB1* y *EPHA1*. Estos tres genes están implicados en diferentes funciones: *SHROOM1* está asociado con la elongación de las células musculares; *ARRB1* (Arrestin beta 1) es una proteína citosólica que actúa como cofactor desensibilizador de los receptores beta-adrenérgicos, mediado por la *beta-adrenérgico receptor quinasa (BARK)*; y *EPHA1* está implicado en la mediación de procesos del desarrollo, particularmente los del sistema nervioso. Otro importante gen involucrado en rutas relacionadas con el desarrollo muscular es el *SOX8*, que interviene en las rutas “*muscle cell development*” (GO:0055001) y “*striated muscle cell differentiation*” (GO:0051146).

En la comparación TvsR, los genes implicados en *rutas de procesos biológicos* y en *rutas InterPro* codifican la cadena pesada de la miosina (genes *MYH1*, *MYH2*, *MYH4* y *MYH15*), un gen relacionado con la cadena ligera de la miosina (*MYL1*), los genes que codifican la actina alfa (genes *ACTA1* y *ACTC1*, para el músculo cardíaco) y los genes relacionados con la troponina, encargados de la contracción rápida músculo esquelético (genes *TNNI2*, *TNNC2* y *TNNT3*).

Con el software de base de datos IPA (**Tabla 17**), se detectaron varias vías canónicas significativamente activadas. Una de ellas es la ruta “*Actin Cytoskeleton Signaling*”, relacionada con las funciones de la actina, que está presente tanto en la comparación LvsR como en la TvsR, y activada con un z-score de 2,840 y 1,633 en L y T, respectivamente. En la comparación LvsR, también hay otras rutas canónicas significativamente activadas: **1)** “*Regulation of Actin-based Motility by Rho*”, con un z-score de 2.449 y “*Agrin Interactions at Neuromuscular Junction*”, con un z-score de 1.633, ambas activadas en L. **2)** También hay una ruta activada (en la sección de “*Diseases and functions*” de la base de datos IPA, dentro de la categoría “*Skeletal and*

Muscular System Development and Function") denominada "*Muscle contraction*", con un z-score de 1.109 de activación en L. **3**) En TvsR también podemos encontrar una ruta, en la misma sección y categoría, denominada "*Morphology of muscle*", aunque en este caso no está activada ni tiene z-score. No se han encontrado resultados relacionados con la actina/miosina o el desarrollo muscular en los análisis de la base de datos IPA para la comparación LvsT.

4.2.2.3. Grupo del metabolismo de los lípidos:

Se hallaron rutas relacionadas con el metabolismo lipídico (**Tabla 16**) como la "*Neutral lipid metabolic process*" (GO:0006638), "*Fat cell differentiation*" (GO:0045444) y "*cellular lipid catabolic process*" (GO:0044242), presentes para LvsT y LvsR. Sin embargo, la mayoría de las vías relacionadas con los lípidos están presentes sólo para la comparación LvsR, como la "*positive regulation of lipid metabolic process*" (GO:0045834), "*lipid homeostasis*" (GO:0055088), "*lipid storage*" (GO:0019915), "*regulation of lipid metabolic process*" (GO:0019216), "*triglyceride metabolic process*" (GO:0006641), "*fatty acid biosynthetic process*" (GO:0006633), "*brown fat cell differentiation*" (GO:0050873), y la ruta *InterPro* "*fatty acid desaturase-1*" (IPR005804).

En cuanto a genes concretos del metabolismo lipídico (**Tabla 15** y **Tabla 16**), el gen *FABP4*, un GDE presente en rutas de las comparaciones LvsT y LvsR, codifica la proteína de los adipocitos necesaria para la unión de los ácidos grasos. Las funciones de *FABP4* incluyen la captación, el transporte y el metabolismo de los ácidos grasos. Por otro lado, en casi todas las vías relacionadas con el metabolismo de los lípidos, y en concreto para la comparación LvsR, aparecen los genes *SCARB1* y *APOA1*. El primero codifica la proteína que media en la transferencia de colesterol dentro y fuera de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), mientras que *APOA1* codifica la apolipoproteína A-1, que es el principal componente proteico de las HDL en el plasma sanguíneo e

induce el transporte de colesterol desde los tejidos al hígado para su excreción, además de ser un cofactor para la lecitina-colesterolacil-transferasa (*LCAT*), una enzima responsable de la formación de la mayoría de los ésteres de colesterol del plasma. De otro lado, los genes *EBF2* y *LAMA4* están relacionados con las rutas “*brown fat cell differentiation*” (GO:0050873) y “*fat cell differentiation*” (GO:0045444). Asimismo, el ya mencionado *SOX8* está también implicado en la diferenciación de las células grasas (GO:0045444). Otro gen que se ha encontrado en varias rutas es el *FADS2*, que codifica una proteína que es miembro de la familia de genes de la desaturasa de ácidos grasos (*FADS*), y precisamente estas proteínas enzimáticas regulan la insaturación de los ácidos grasos mediante la introducción de dobles enlaces entre carbonos específicos de la cadena de ácidos grasos.

En el presente estudio no se encontraron vías relacionadas con el metabolismo de los lípidos en la comparación TvsR. Entre las rutas génicas canónicas (software de base de datos IPA; **Tabla 17**) se encontraron rutas relacionadas con el metabolismo lipídico para las comparaciones LvsT y LvsR. Sin embargo, tampoco se encontraron rutas de este tipo para la comparación TvsR. No obstante, en LvsT, la ruta “*Fatty Acid α -oxidation*” se encuentra no activada, con un $-\log(p)$ de 0.987 y sin z-score, y en esta ruta sólo interviene un GDE de los estudiados, el *ALDH4*.

4.2.2.4. *Validación RNAseq*

Para comprobar que los resultados obtenidos por RNAseq tienen validez, es necesario validarlos con un estudio de expresión de varios genes identificados por RNAseq y calcular la correlación de Pearson entre los resultados obtenidos por qPCR y por RNAseq, calculando también el valor CCC y el p-valor de las comparaciones. En este estudio se eligieron 12 genes diferencialmente expresados por RNAseq y se comprobó que la mayoría de los genes tenían una buena correlación en las tres comparaciones y p-valores menores de 0,05, además de tener los CCC de 0,94, 0,87 y 0,96 para LvsT, LvsR y TvsR respectivamente, confirmando que los resultados de RNAseq están muy relacionados con los de qPCR.

Tabla 20. Validación de 12 genes diferencialmente expresados por RNAseq y su CCC

Gen	Validación RNAseq				CCC
	RNAseq	qPCR	Correlación		
	Log2 FC	Log2 FC	R ²	P-valor	
Lampiño vs Torbiscal					
AGPAT	-0.015	-0.140	0.387	0.214	0.939606
GPX1	-1.961	-2.471	0.919	0.000	
FADS2	0.151	0.824	0.769	0.003	
ACTA1	-0.002	0.052	0.403	0.194	
COL3A1	0.672	0.937	0.969	0.000	
MYL1	-0.136	-0.193	0.850	0.000	
FES	0.335	0.759	0.611	0.035	
FOS	-1.352	-1.814	0.994	0.000	
ACTC1	1.102	1.250	0.987	0.000	
DNAJA1	0.432	0.534	0.964	0.000	
VEGFA	0.536	0.655	0.857	0.000	
PVALB	-0.937	-0.558	0.898	0.000	
Lampiño vs Retinto					
AGPAT	0.471	0.587	0.804	0.002	0.8773521
GPX1	-0.969	-1.196	0.975	0.000	
FADS2	0.066	0.961	0.757	0.004	
ACTA1	0.286	0.708	0.284	0.371	
COL3A1	0.401	0.639	0.945	0.000	
MYL1	0.143	0.479	0.635	0.027	
FES	0.111	0.681	0.270	0.396	
FOS	-1.530	-1.901	0.960	0.000	
ACTC1	-1.271	-1.437	0.985	0.000	
DNAJA1	-0.298	-0.122	0.869	0.000	
VEGFA	-0.114	0.006	0.831	0.001	
PVALB	1.000	1.862	0.906	0.000	
Torbiscal vs Retinto					
AGPAT	0.485	0.260	0.060	0.852	0.957083
GPX1	0.992	0.336	-0.007	0.983	
FADS2	-0.085	0.137	0.232	0.468	
ACTA1	0.288	0.609	-0.156	0.627	
COL3A1	-0.271	-0.299	0.899	0.000	
MYL1	0.279	0.671	0.764	0.004	
FES	-0.224	-0.077	0.197	0.540	
FOS	-0.178	-0.087	0.975	0.000	
ACTC1	-2.373	-2.687	0.986	0.000	
DNAJA1	-0.730	-0.655	0.835	0.001	
VEGFA	-0.650	-0.649	0.934	0.000	
PVALB	1.936	2.420	0.901	0.000	

5. Discusión General

5.1. Composición corporal ecográfica

La grasa subcutánea en porcino es un carácter de gran importancia en la conformación de una canal, y está inversamente relacionada con el rendimiento cárnico magro de una canal de cerdo comercial (Fortin, 1986), y directamente con el rendimiento de canal en el caso del cerdo Ibérico, en el que permite además que tras una larga curación se produzcan jamones y paletas de excelente calidad organoléptica. La grasa subcutánea está dividida en tres capas claramente definidas (McEvoy *et al.*, 2007; Ayuso *et al.*, 2020) y se diferencian tanto en su crecimiento como en su metabolismo lipídico (D. Ayuso *et al.*, 2020; Ortiz, García-Torres, González, Contador, & Tejerina, 2020). La importancia de medir las capas de grasa por separado ha sido indicada por diversos autores, ya que es conocida la asociación entre el espesor de la capa interna de grasa subcutánea con la cantidad de grasa intramuscular (Moody & Zobrisky, 1966), que a su vez está relacionada con la calidad de la carne (Wood *et al.*, 2008) e incluso podría ser un indicador de la edad del animal (Ortiz *et al.*, 2020). Las capas de grasa se pueden medir directamente en la canal del cerdo tras el sacrificio, pero también utilizando la tecnología de ultrasonido en tiempo real, que ha sido comprobada como muy útil para medir la composición corporal en cerdos vivos antes del sacrificio (Moeller y Christian, 1998; Sather *et al.*, 1997; Ayuso *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2019). Dado lo sencillo e inocuo de esta tecnología, varios autores han llevado a cabo, como en el presente estudio, ecografía seriada a diferentes pesos vivos en diferentes localizaciones para evaluar los cambios en las capas de grasa dorsal previamente al sacrificio (McEvoy *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2019). En el presente estudio, además de medir las capas de la grasa dorsal y la grasa sobre el glúteo, descritas por varios autores (Fortin, 1986; Font-i-Furnols *et al.*, 2021), hemos realizado mediciones de grasa y músculo en otros puntos anatómicos como el músculo semitendinoso (D. Ayuso *et al.*, 2013) para caracterizar la pieza noble por excelencia en el cerdo Ibérico que es el jamón.

En el sistema de producción del cerdo Ibérico en pureza, los animales se alimentan de manera restringida hasta aproximadamente los 12 meses, o hasta alcanzar aproximadamente unos 100 kg de peso vivo, para evitar un excesivo engrasamiento temprano, ya que son animales que tienen el mecanismo de la saciedad alterado (Fernández-Fígares, Lachica, Nieto, Rivera-Ferre, & Aguilera, 2007), y a partir de ese momento y hasta alcanzar aproximadamente los 160 kg, durante la fase de finalización (acabado), se alimentan *ad libitum*.

No hay muchos estudios que comparen los cambios en la deposición grasa y acreción muscular durante la fase de finalización en las estirpes del cerdo Ibérico. En el presente estudio, a 100 kg de peso vivo (justo antes de iniciar la fase de finalización) se observó que los Torbiscuales ya presentaban un mayor área y diámetro del lomo que las otras dos estirpes, lo que siguió ocurriendo *tras el acabado*, pues el Torbiscal tuvo un mayor rendimiento del lomo en los pesos *postmortem*. Por otra parte, a este peso (100 kg) fue la estirpe Retinta la que tuvo mayor espesor de grasa supraglútea y de grasa dorsal media.

Posteriormente, durante la fase de acabado, se producen cambios significativos en la composición grasa y muscular. En el presente estudio, los datos ecográficos obtenidos justo antes del sacrificio revelaron que la Retinta depositó más musculatura glútea que las otras dos estirpes, pero el espesor de la grasa supraglútea fue igual en las tres estirpes. En relación a la medida del área del músculo semitendinoso, tras el acabado, fue mayor en la estirpe Lampiña, que también depositó más grasa sobre este músculo. Por tanto, durante la fase de finalización, la acreción muscular más importante ocurrió de forma diferente en las tres estirpes, en la Retinta en los glúteos, en la Lampiña en el semitendinoso, y en la Torbiscal en el lomo, aunque en este último caso no se alcanzó la significación. Esto ocurrió tanto en los animales de cebo como en los de montanera, puesto que no hubo una interacción significativa genotipo x sistema en cuanto a la acreción muscular. También Izquierdo *et al.* (2018) comprobó que la

estirpe Torbiscal tenía mayor área del lomo y un mayor rendimiento del lomo que la Retinta.

En cuanto a las interacciones genotipo x sistema, la Lampiña fue la que depositó más grasa supraglútea (GGLUf) en el sistema de cebo de campo (de aquí en adelante “cebo”) y la Torbiscal en el de cebo de montanera (de aquí en adelante “montanera”), habiendo por tanto una interacción. También la Lampiña depositó más grasa sobre el semitendinoso (GSTf) que las otras dos estirpes, tanto en cebo como en montanera, mientras que Retinto y Torbiscal depositaron más GSTf en montanera que en cebo, existiendo pues otra interacción en este caso.

En relación a las capas de la grasa dorsal, en nuestro estudio, la grasa media fue la que se depositó con mayor espesor, seguida de la interna. Almeida *et al.*, (2019) encontraron que, en la zona lumbar, la capa media (a la que ellos denominaron interna, al definir sólo dos capas) es la que se depositó en mayor espesor. En relación a la capa externa, apenas creció medio centímetro en nuestro estudio durante el acabado. Similares resultados fueron observados por Fortin (1986) en la raza Yorkshire durante el acabado (hasta los 135 kg de peso vivo). También, Almeida *et al.* (2019) encontraron que la capa externa se deposita más lentamente que la capa media a nivel del lomo en cerdos Alentejanos, que son muy similares a los Ibéricos. Sin embargo, McEvoy *et al.*, (2007) encontraron un mayor crecimiento de la capa externa que de la interna, pero solo hasta los 124 kg de peso vivo, lo que podría indicar un mayor crecimiento de la capa externa a pesos más bajos y la ralentización del crecimiento de dicha capa a pesos superiores. Pero los resultados de Almeida *et al.*, (2019) indican lo contrario, ya que reportaron que la capa externa creció más a pesos más altos. A este respecto cabe indicar también que, en el presente estudio, la capa externa creció significativamente más en la Torbiscal que en las otras dos estirpes.

En relación al sistema de alimentación también hubo diferencias en la deposición grasa y acreción muscular en el presente estudio durante el acabado. No hubo diferencias en el crecimiento del espesor de glúteo entre los dos sistemas de

alimentación, pero el área del semitendinoso creció más en los animales de montanera que en los de cebo, lo que podría ser una consecuencia del mayor ejercicio que realizan los animales de montanera, lo que parece no haber afectado a la zona glútea pero sí a la musculatura posterior del muslo (semitendinoso), que, como extensor de la articulación de la cadera y flexor de la rodilla (junto con el bíceps femoral), plausiblemente se ejercitó más durante la locomoción que los glúteos medio y profundo ecografiados (que actúan sólo sobre la articulación de la cadera). Probablemente los Lampiños, debido a su menor altura y a la menor longitud relativa de sus patas, tuvieron que realizar mayores esfuerzos musculares que las otras dos estirpes, especialmente al tener que competir con ellas en la búsqueda de bellota. Así, los miembros cortos del Lampiño explicarían la mayor área del semitendinoso tras el acabado. De otro lado, las plausiblemente mayores distancias recorridas durante la montanera, debido a la dispersión de las fuentes de alimentación (encinas vs comedero) explicarían la mayor área del semitendinoso tras la montanera (vs cebo de campo) en las tres estirpes. Posiblemente el bíceps femoral (el músculo más voluminoso del miembro posterior) también se haya desarrollado más durante la montanera, pero al ser demasiado ancho para poder obtener una imagen ecográfica de su perímetro, la elección del semitendinoso como músculo ecografiable representativo del miembro posterior (y del jamón) parece apropiada, además de la ecografía glútea, especialmente a tenor de los crecimientos observados en el semitendinoso en el presente estudio.

El área y espesor del lomo fueron mayores en cebo que en montanera, al contrario que lo ocurrido con el semitendinoso. Así pues, el crecimiento del lomo pareció estar más determinado por la cantidad de proteína en la dieta (mucho más alta en el pienso que en la bellota) que por el ejercicio (plausiblemente menor en el cebo de campo). Por otro lado, se han realizado diversos estudios de los efectos de la composición de la dieta según el sistema de alimentación (proteína estándar, baja proteína, y montanera; Palma-Granados *et al.*, 2019) sobre la deposición grasa en cerdos Ibéricos, ya que el sistema de montanera se caracteriza por bajos niveles de

proteína y elevados niveles de hidratos de carbono (Tejeda et al., 2020). El sistema de alimentación tuvo un efecto significativo en el presente estudio, ya que los animales de montanera presentaron más grasa dorsal total y más espesor graso en cada una de sus capas que los de cebo de campo. Estos resultados difieren de los obtenidos por Tejeda *et al.*, (2020), ya que estos autores no encontraron diferencias ni para la grasa total ni para las tres capas de grasa entre el sistema de cebo convencional (intensivo) y el de montanera en Ibéricos Retintos. Si consideramos sólo los animales Retintos de nuestro estudio, no hubo diferencias entre el sistema de cebo de campo y el de montanera para la capa de grasa media, pero sí hubo diferencia entre sistemas para las otras estirpes. Por tanto, las discrepancias del presente estudio con el de Tejeda *et al.* (2020) se pueden deber a que los animales de este último estudio eran de estirpe Retinta, el lomo se midió al nivel de la última costilla y se sacrificaron con 174 kg (a mayor peso que los del presente estudio). En cambio, Palma-Granados *et al.*, (2019) sí que observaron una mayor deposición graso en los cerdos alimentados con baja proteína que con los de alta proteína, lo que sería asimilable a lo ocurrido en el presente estudio.

Las interacciones aquí discutidas son importantes, ya que nos indican si los genotipos se comportan de forma diferente según el sistema de alimentación, tema que también fue tratado en el estudio de Palma-Granados *et al.* (2019). Así en el presente estudio, la estirpe Torbiscal depositó más grasa dorsal media y externa en montanera que en cebo, mientras que los Lampiños y Retintos depositaron dichas capas de forma similar en los dos sistemas. Por tanto, la deposición graso no sólo varió con el peso del animal, la localización anatómica o la dieta, sino que también hay que considerar el genotipo del animal. Almeida *et al.* (2019) también encontraron interacciones significativas entre genotipo (Ibérico puro vs Ibérico x Large White) y alimentación (cebo intensivo vs montanera) en la deposición graso de algunas capas dorsales. En resumen, en el presente estudio las interacciones entre genotipo y ambiente para los diferentes depósitos grasos son debidas a que la estirpe Torbiscal se comportó de manera diferente en cebo que en montanera.

5.2. Parámetros sanguíneos

En relación a los parámetros metabólicos, en el presente estudio se evalúan algunos parámetros metabólicos sanguíneos de interés al inicio y al final de la fase de acabado de las tres estirpes de cerdo Ibérico estudiadas y en los dos sistemas de alimentación. A este respecto cabe indicar que no existen apenas trabajos definiendo estos valores sanguíneos en la raza Ibérica, y mucho menos en las tres estirpes Ibéricas, así pues, este estudio aportará unos resultados que servirán para caracterizar la raza Ibérica y sus estirpes, además de para evaluar los cambios que se producen en la fase de acabado en los dos sistemas, cebo de campo y montanera.

Urea

Al final de la fase de crecimiento, antes de iniciar la fase de acabado, la estirpe Lampiña tuvo mayores niveles de urea en sangre que las otras dos estirpes. Considerando que las dietas eran iguales para las tres estirpes, estos niveles podrían indicar que esta estirpe en especial tiene menores necesidades de proteína que las otras dos, ya que la excreción de urea está directamente ligada a la eliminación del exceso de nitrógeno de la dieta (Folin, 1905). También cabe resaltar que los valores de urea fueron más altos, casi el doble que los valores descritos por Bressan *et al.* (2021) para cerdos Alentejanos y Landrace x Large White, a 120 kg de peso, con una cantidad de proteína en la dieta similar a la del presente estudio, que fue de 14gr/100g de materia seca. Por otra parte, Martins *et al.* (2021) reportaron valores de urea en sangre en cerdos Alentejanos mucho más bajos que los nuestros, con un contenido proteico en la dieta algo más baja, de 10 g/100g de proteína. Esto podría deberse a una característica genética de esta raza porcina Ibérica. De hecho, como indican otros autores, como (Nieto, Lara, García, Vílchez, & Aguilera, 2003) el porcino Ibérico necesita un 35% menos de proteína en la dieta que las razas convencionales, y por tanto los animales del presente estudio tenían más proteína de la necesaria en la dieta,

sobre todo, como ya se ha indicado, los de la estirpe Lampiña. De todas formas, las diferencias en los niveles de urea entre el estudio de Bressan *et al.* (2021; con Alentejanos) y el presente estudio (con Ibéricos en sistema de cebo de campo) con similares concentraciones de proteína en la dieta y un peso similar de sacrificio, en principio parecen explicarse únicamente por diferencias genéticas entre Ibéricos y Alentejanos, siendo estos últimos más eficientes (Comaet *al.*, 1995) a la hora de metabolizar la proteína que los Ibéricos, lo que parece cierto, ya que los Alentejanos presentaron los mismos niveles de urea a 160 kg que los cruzados Landrace x Large White (Bressan *et al.*, 2021). Así pues, podría ser interesante formular dietas diferentes para el Ibérico, con menos proteína, sobre todo para la estirpe Lampiña, tanto durante la fase de crecimiento como en la de acabado.

Por otra parte, al evaluar los cambios en los niveles de urea durante el acabado, la estirpe Torbiscal, con un mismo peso de sacrificio y similar ganancia media diaria (GMD) que la Retinta, se observa que tuvo un balance de urea negativo (decreció durante esta fase), indicando que posiblemente la estirpe Torbiscal, al experimentar mayor acreción muscular que la Retinta, tiene una mayor necesidad proteica, ya que según Comaet *al.* (1995), una reducción de los niveles de urea en sangre puede deberse a un uso más eficiente del nitrógeno y a un aumento del tejido magro. En el presente estudio, los cambios de nivel de urea en sangre fueron positivos para los animales alimentados en el sistema de cebo de campo, posiblemente debido al alto nivel de proteína del pienso, y los cambios fueron negativos para los alimentados en montanera, posiblemente debido a los bajos niveles de proteína de la bellota (Tejerina, García-Torres, Cabeza de Vaca, Vázquez, & Cava, 2011). Martins *et al.* (2021) encontraron mayores niveles de urea en la sangre de cerdos que hacían ejercicio que en los que no lo hacían (manteniendo a ambos con la misma dieta), lo que atribuyeron al catabolismo proteico que se produce durante el ejercicio. En el presente estudio, los posibles incrementos de urea que se pudieron estar produciendo a causa del catabolismo proteico debido al mayor ejercicio en montanera (McLaughlin & Fish, 1994) parece que no compensaron los bajos niveles de proteína que ingirieron los

animales de monterera, resultando en decrementos de uremia. Además, entre de los animales acabados en cebo de campo, los Torbiscales tuvieron incrementos significativamente más bajos de urea que las otras estirpes. En cambio, entre los animales alimentados en montanera, la uremia descendió, pero en menor proporción para la estirpe Retinta, posiblemente porque deposita menos músculo y más grasa que la Torbiscal (Izquierdo *et al.*, 2018) y parece la estirpe menos afectada por la baja proteína de la bellota.

Triglicéridos

La estirpe Lampiña antes del acabado es también la que tuvo mayor cantidad de triglicéridos en sangre. Éstos son un indicador del estado nutricional y metabólico del animal, y cuanto más proteína se ingiere más urea y más triglicéridos aparecen en sangre, como indican también los resultados de las correlaciones del presente estudio entre los incrementos de urea, triglicéridos, lactato y glucosa. Este resultado parece sugerir que los Lampiños podrían estar más sobrealimentados que las otras dos estirpes durante el período de crecimiento hasta el principio del acabado, bien porque tengan menos necesidades proteicas, o bien porque tengan una mayor ingesta de alimento, aunque las tres estirpes recibieron las mismas raciones. Diversos estudios (Bressan *et al.*, 2021; Rauw *et al.*, 2007) indicaron que a mayor ingesta de alimento, sobre todo si es rico en grasa e hidratos de carbono, mayores niveles de triglicéridos aparecen en sangre. De todas formas, ninguna estirpe excedió los valores máximos reportados por otros autores en esta fase. Aparte de esto, los niveles en Lampiño fueron superiores a los descritos por Mejía *et al.*, (2012), Bressan *et al.* (2021) y Martins *et al.* (2021).

Si evaluamos los valores tras el acabado, los incrementos de triglicéridos en sangre fueron significativamente mayores en la estirpe Retinta, estando los valores finales muy cerca del el límite superior de los valores fisiológicos para porcino, y por

encima de los reportados por Torres-Rovira *et al.* (2011) en cerdas ibéricas (33-43 mg/dl), Nichols *et al.* (2015; 19-66 mg/dL) y los descritos en la raza Alentejana por Martins *et al.* (2021; 50 mg/dL) y Bressan *et al.* (2021; 60 mg/dL), siendo los del presente estudio de 83, 78 y 125mg/dL para el Lampiño, Torbiscal y Retinto, respectivamente. Esto puede ser debido a un mayor metabolismo lipídico en la estirpe Retinta, como sugiere el presente estudio más adelante en la comparación de los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en las tres estirpes. En relación a los incrementos de triglicéridos durante el acabado, hubo una interacción significativa genotipo x sistema, de manera que los incrementos de triglicéridos fueron positivos en el cebo de campo y negativos o muy bajos en la montanera, si bien se sabe que el ejercicio moviliza lípidos desde los adipocitos a la sangre (Carey, 1997), pero esos triglicéridos sanguíneos deben transformarse después en energía, como sugiere el estudio de Martins *et al.* (2021), que obtuvo niveles más bajos de triglicéridos en sangre en cerdos Alentejanos que hacían ejercicio que en los que no lo hacían, teniendo ambos la misma dieta. Por tanto, el ejercicio no parece aumentar la trigliceridemia en cerdo Alentejano ni en los Ibéricos del presente estudio, a pesar de que fueron alimentados con bellotas (bajas en proteína y altas en hidratos de carbono). Estos altos incrementos de triglicéridos en sangre en los Retintos se acompañaron de incrementos, altos también, de glucosa, pero todo ello no pareció contribuir a un posible síndrome prediabético, ya que los incrementos de fructosamina no estaban aumentados (Nichols *et al.*, 2015).

Lactato

Los niveles de lactato aumentan en la sangre en situaciones de escasez de oxígeno, ocasionadas generalmente por situaciones de estrés o de ejercicio intenso o prolongado. Tanto durante la fase de crecimiento como al final del acabado, los niveles de lactato fueron similares en las tres estirpes, y tampoco hubo diferencias entre genotipos en los incrementos durante el acabado. En cambio, comparando entre

sistemas, los niveles de lactato finales y los incrementos durante el acabado fueron significativamente más elevados en los animales de cebo de campo que en los de montanera, por lo que quizá se podría especular que los animales de montanera tuvieron menos estrés que los de cebo de campo, que estuvieron alojados en grandes corrales al aire libre (según la norma de calidad del Ibérico para esta clasificación), pero dispusieron de mucho menos espacio que los animales de montanera. De hecho, Martins *et al.*, (2012) encontró, en cerdo Alentejano, niveles más altos de cortisol (indicador de stress) en los animales que no hacían ejercicio que en los que lo hacían, que además disponían de mayor espacio para caminar hacia los bebederos.

Glucosa

La glucosa es fuente de energía y la glucemia está, por tanto, relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono. La glucosa puede almacenarse en forma de glucógeno o pasar a la sangre, en cuyo caso puede transformarse en ácidos grasos (síntesis *de novo*), de ahí su correlación positiva con los niveles de triglicéridos. En cuanto a la glucemia justo antes del acabado, en el presente estudio no hubo diferencias significativas entre las tres estirpes, siendo este además el parámetro más homogéneo entre ellas. Además, sus valores estuvieron dentro de los rangos fisiológicos para porcino y fueron muy similares a los indicados por otros autores, como Torres-Rovira *et al.*, (2011) en cerdas Ibéricas, y Nichols *et al.*, (2015) en Poland/China y cruces de Yorkshire; aunque fueron ligeramente inferiores a los descritas por Bressan *et al.*, (2021) en cerdos Alentejanos a 90 y a 120 kg de peso vivo, pero fueron similares a los descritos por Martins *et al.*, (2021), también para cerdos Alentejanos.

En cuanto a los niveles de glucosa tras el acabado, si bien siguieron dentro de los límites fisiológicos, estuvieron más elevados en la estirpe Retinta que en las otras dos y fueron más altos en los animales de cebo de campo que en los de montanera,

siguiendo pues la misma tendencia que los niveles de triglicéridos y de urea. Por otra parte, los niveles de glucosa en Torbiscal y Retinto fueron mayores en los animales de cebo que en los de montanera, pero para el Lampiño fueron iguales en cebo y montanera, lo que indica la interacción genotipo x sistema y parece indicar que en esta estirpe los niveles de glucosa no se vieron afectados ni por la composición de la dieta ni por el ejercicio. Martins et al., (2021) también obtuvo los mismos valores de glucosa para Alentejanos con y sin ejercicio y con la misma dieta. Aunque en el presente estudio cabría esperar mayores valores de glucosa en los animales de montanera por un mayor aporte energético de la bellota, pero quizá esto pueda ser compensado por el mayor ejercicio que tienen que hacer los cerdos de montanera al buscar las bellotas y por el gasto energético en la termorregulación al estar más tiempo expuestos al viento con bajas temperaturas.

Fructosamina

Pequeños incrementos en los niveles sanguíneos de fructosamina son indicadores de diabetes y complicaciones vasculares, como ateromas en cerdos y en humanos (Nichols *et al.*, 2015). La fructosaminemia fue más elevada en los Torbiscuales que en los Retintos al final de la fase de crecimiento, y en los tres casos fue muy superior a los valores reportados por Nichols *et al.* (2015), lo que podría indicar que los cerdos Ibéricos tienen mayores valores de fructosamina en sangre que los de otras razas, como el caso de los Poland/China o cruzados de Yorkshire de dicho estudio. Pero, curiosamente, los valores tras el acabado fueron ligeramente menores que los iniciales, con lo que los cambios fueron negativos, y además ambos tipos de parámetros no presentaron diferencias entre estirpes. Tampoco se encontraron diferencias entre los sistemas de acabado para la fructosaminemia final y su cambio anterior. No obstante, cabe reseñar que en todos los casos los errores para este carácter fueron muy elevados.

Colesterol

Los niveles de Colesterol en sangre dependen de la dieta, de la absorción intestinal de colesterol, de la síntesis endógena, del tipo de tejido, del metabolismo de las lipoproteínas y de la excreción biliar. Es también un parámetro muy influenciado por la genética. En el presente estudio no hubo diferencias significativas entre estirpes para los niveles de colesterol en sangre al final del crecimiento. Además, dichos niveles estuvieron dentro de los niveles fisiológicos y fueron similares a los descritos por Nichols et al., (2015).

Sin embargo, tras el acabado, los niveles aumentaron considerablemente con respecto a los valores pre-acabado, y además fueron significativamente más altos en Retinto que en Torbiscal, aunque los incrementos fueron similares en las tres estirpes. Curiosamente, no hubo diferencias entre los animales alimentados en el sistema de cebo de campo y los de montanera, pero los incrementos fueron mayores en los alimentados en montanera, aunque el efecto fue sólo una tendencia. A pesar del aumento que se produjo durante el acabado en los niveles de colesterol (de 100 a 136 mg/ml), estos niveles están muy por debajo de los indicados por Nichols et al., (2015) en los animales con arterioesclerosis moderada (320 mg/ml). Así pues, durante la fase de acabado, en la que los animales comen *ad libitum* y depositan gran cantidad de grasa, los niveles de colesterol no llegaron a ser tan altos como para provocar una patología cardiovascular. Los valores reportados por Bressan et al., (2021; 105mg/dL) en cerdos Alentejanos son ligeramente inferiores a los encontrados en el presente estudio, y se aproximan más a los de la estirpe Torbiscal. Por otra parte, Martins et al., (2021) obtuvo valores (130mg/dL) semejantes a los del presente estudio, pero aquél fue llevado a cabo con cerdos confinados, sin ejercicio, que alcanzaron valores significativamente más altos que los que hicieron ejercicio. Sin embargo, en el presente estudio los valores de colesterol fueron semejantes en los dos sistemas de acabado, independientemente del ejercicio.

Asociaciones entre parámetros sanguíneos

En el presente estudio, según los resultados de las tablas de correlaciones, los incrementos de los niveles de urea estuvieron positivamente asociados a los de triglicéridos, lactato y glucosa, y no estuvieron asociados a los cambios en fructosamina ni en colesterol. Para entender las asociaciones que hubo, es preciso tener en cuenta que, en general, cuando aumentan los niveles de proteína en la dieta aumenta la Glucosa 6-fosfato, porque el ciclo del metabolismo de la urea está directamente ligado al ciclo a la gluconeogénesis (Watford, 2003). Así pues, como sugieren las correlaciones del presente estudio recién expuestas, los incrementos importantes en la ingesta de proteína están asociados a incrementos en urea, triglicéridos y glucosa en la sangre, pero no van asociados a cambios en fructosamina o colesterol, que están más influenciados por el metabolismo lipídico, en concreto el de los ácidos grasos, y sobre el que existe más influencia de los genes, como se detallará más adelante.

También, en general, si aumenta la urea en sangre se produce síntesis *de novo* de ácidos grasos y así se incrementa la trigliceridemia. Precisamente, en el presente estudio hubo una correlación positiva entre el incremento de los triglicéridos y el incremento de glucosa, y en menor medida de colesterol. Bressan et al., (2021) también encontraron que cuando aumentó la glucemia también aumentó la triglicéridemia, pero no la colesterolemia.

En el presente estudio también se halló que los incrementos de colesterol estuvieron correlacionados con incrementos de triglicéridos y de fructosamina. Nichols *et al.* (2015) también encontraron una asociación entre las variaciones de los niveles de colesterol y los de fructosamina. Por otra parte, en el presente estudio los incrementos en la fructosamina estuvieron asociados únicamente a los incrementos en colesterol. También Nichols *et al.* (2015) encontraron que cuando se

incrementaban considerablemente los niveles de colesterol se incrementaban los de fructosamina.

5.3. Características de la canal, perfil lipídico y expresión génica

Características de la canal

No son muchos los estudios que han comparado la deposición de grasa y el metabolismo entre diferentes estirpes o líneas dentro de la raza ibérica. Astiz and Alfranca (1998);Clemente et al. (2008), Ibáñez-Escriche et al. (2016) e Izquierdo et al. (2018) encontraron diferencias notables en la deposición grasa y el metabolismo de los ácidos grasos entre estirpes de la raza Ibérica, lo que en algunos casos podría deberse al origen genético común muy diferente entre algunas de las estirpes de cerdo Ibérico como entre el Retinto y el Lampiño (Dieguez, 2000b; Clemente *et al*>, 2006). Las diferencias en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos se han estudiado previamente en la raza Ibérica frente a Duroc x ibérico (Óvilo et al., 2014), en Ibéricos frente a Duroc puros (Benítez et al., 2018) y entre estirpes Ibéricas y sus cruces (Villaplana-Velasco et al., 2021). En el presente estudio, no sólo el genotipo, sino también el sistema de alimentación afectaron significativamente a la deposición grasa y a los perfiles de ácidos grasos, como también reportaron previamente Daza et al. (2007), Martins et al. (2015) y Rey et al. (2006). También se encontraron diferencias en la expresión de genes relevantes implicados en los procesos lipogénicos musculares.

En cuanto al efecto del genotipo, la estirpe Torbiscal tuvo mayores rendimientos de piezas nobles que la Retinta, siendo la Lampiña intermedia. Esto contrasta con los resultados reportados por Clemente et al., (2008), quienes reportaron que el Torbiscal tuvo el mayor peso de canal, pero obtuvo unos menores rendimientos de piezas nobles. Esto puede deberse al mayor peso de sacrificio del Torbiscal en su estudio (172 kg) vs los del Retinto (162 kg) y Lampiño (144 kg), ya que a medida que aumenta el peso vivo disminuyen los rendimientos de las piezas nobles (J. García-Gudiño et al., 2013). En el presente estudio, el Retinto tuvo el mayor contenido de grasa intramuscular, aunque esta diferencia sólo fue una tendencia

($p=0,079$). Estos resultados son similares a los obtenidos por Ibáñez-Escriche et al. (2016), quienes reportaron los valores más bajos de grasa intramuscular para el genotipo Torbiscal en comparación con el Retinto. Estudios anteriores, como el de Benito et al. (2000), no reportaron diferencias significativas entre los mismos tres genotipos para la grasa intramuscular del jamón, y Clemente et al. (2008) reportaron más contenido de grasa intramuscular en el músculo Longissimus dorsi en la estirpe Lampiña.

En relación con el efecto del sistema de alimentación, en el presente estudio los cerdos de cebo de campo tuvieron mejores rendimientos de piezas nobles que los cerdos de montanera. Además, Tejeda et al. (2002) reportaron que la grasa intramuscular en el Biceps femoris fue mayor en cerdos acabados en el sistema de montanera que en cerdos acabados con concentrado comercial, debido al mayor contenido en lípidos e hidratos de carbono de las bellotas en comparación con el concentrado (Tejerina et al., 2011). Por el contrario, en el presente estudio no hubo diferencias en la grasa intramuscular del lomo entre los sistemas de alimentación. Cuando los animales son acabados en extensivo, otro factor que puede afectar a la deposición grasa es el nivel de ejercicio, que puede aumentar el consumo de energía, reduciendo así la acumulación de grasa. En el presente estudio, el porcentaje de grasa intramuscular fue significativamente menor en los animales de montanera, lo que es consistente con la hipótesis de la influencia del nivel de ejercicio.

Perfil lipídico de la grasa subcutánea

Los perfiles de ácidos grasos dependen de la composición de la dieta y también del nivel de actividad enzimática que determina el potencial de síntesis endógena. La enzima Esteroil-CoA Desaturasa (*SCD*), es una de las principales enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos, y varía entre genotipos e incluso entre diferentes tejidos (Estévez et al., 2003). Los resultados obtenidos en el presente estudio de la grasa subcutánea indican claramente un efecto del genotipo sobre el metabolismo de los ácidos grasos. El hecho de que el Retinto depositara más ácido oleico y MUFA que las

otras estirpes está probablemente asociado a su mayor expresión del gen *SCD*, que participa en la síntesis *de novo* y en la desaturación de los ácidos grasos. De hecho, la correlación entre los valores de expresión del gen *SCD* y los porcentajes de ácidos grasos oleicos o MUFA fue moderada pero estadísticamente significativa, siendo de 0.39 ($P=0,0012$) y 0,41 ($P=0,0006$), respectivamente. Además de la mayor deposición de MUFA, el Retinto depositó más grasa intramuscular (**GIM**) que las otras dos estirpes, lo que coincide parcialmente con los resultados reportados por Poklukar *et al.* (2020), quienes establecieron, para razas porcinas locales (diferentes a la ibérica), una relación directa entre una mayor deposición de GIM y una mayor proporción de SFA y MUFA, además de una menor proporción de PUFA, aunque en el presente estudio el mayor porcentaje de GIM se asoció sólo con un mayor porcentaje de MUFA en Retinto. Asimismo, Sellier (1998) y Estévez *et al.* (2003) reportaron que los cerdos Ibéricos más magros tienen mayores proporciones de PUFA en la grasa dorsal y de GIM, y también comunicaron correlaciones negativas entre el porcentaje de PUFA y el porcentaje de GIM.

En contraste con los resultados del presente estudio, Estévez *et al.* (2003) no encontraron diferencias significativas para el ácido oleico, MUFA, SFA y PUFA a 90 kg de peso corporal entre las mismas tres estirpes de cerdos Ibéricos. Esta discrepancia puede deberse a las diferencias de edad y peso corporal entre los estudios. Probablemente, a lo largo del periodo de acabado (más allá de los 90 kg) las diferencias en el metabolismo lipídico entre las tres estirpes se hacen cada vez más evidentes a medida que aumenta la deposición grasa. Por otro lado, Juárez *et al.* (2009) compararon estas tres estirpes Ibéricas a un peso corporal medio de 160-180 kg y no encontraron diferencias en MUFA y PUFA, aunque la estirpe Torbiscal tuvo una mayor deposición de SFA que las otras dos estirpes. Estos autores reportaron, en comparación con los valores obtenidos en el presente estudio para el grupo de cebo de campo, mayores porcentajes de PUFA (17% vs 11%) y SFA (39% vs 36%) y menores porcentajes de MUFA (44% vs 53%), respectivamente. Es importante considerar que aquellos cerdos del estudio de Juárez fueron alimentados con un concentrado

comercial y que las muestras fueron tomadas del solomillo, por lo tanto, tal vez esta pieza tenga perfiles de ácidos grasos diferentes a los del lomo. Asimismo, Muriel et al. (2004) compararon 4 estirpes Ibéricas (las tres analizadas aquí y el Entrepelado), sacrificadas a 150 kg de peso y alimentadas en régimen de montanera, y no encontraron diferencias significativas en la deposición de ácidos grasos entre los genotipos. Un resultado similar fue reportado por Cava *et al.* (2003), quienes no encontraron diferencias significativas entre estirpes en la composición de ácidos grasos, a diferencia de los resultados del presente estudio.

Otras comparaciones del cerdo Ibérico frente a otras razas comerciales o genotipos cruzados (Ventanas et al. 2006) encontraron diferencias en la deposición de ácidos grasos, con una menor deposición de PUFA en los cerdos ibéricos, lo que resulta en una menor oxidación de la carne y se cree que es útil para la conservación de la carne fresca y curada. Además, la pequeña proporción observada de SFA en el Ibérico en comparación con otras razas implica una menor relación n6/n3 y menores índices de IA e IT, resultando así una grasa más saludable en el cerdo Ibérico, ya que una alta relación n6/n3 parece ser un factor de riesgo para la enfermedad coronaria (Okuyama & Ikemoto, 1999). Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores de SFA, MUFA y PUFA de las tres estirpes del presente estudio, se puede postular que el Retinto tiene la grasa más saludable, y también que la grasa del Retinto y Torbiscal tiene un índice oxidativo menor que el del Lampiño.

En nuestro estudio, como era de esperar, hubo importantes diferencias en la composición de ácidos grasos entre los sistemas de alimentación. Los cerdos acabados en el sistema de montanera presentaron porcentajes significativamente mayores de ácido oleico, linoleico y linolénico que los acabados con concentrado (53% vs 50%, 11% vs 10% y 2% vs 1%, respectivamente), y estos últimos mostraron mayores valores de SFA, C16:1, C17:1 y C20:1. En consonancia con estos resultados de ácidos grasos, los cerdos alimentados con bellota también tuvieron mayores valores de MUFA y PUFA. Estos resultados están en concordancia con los reportados previamente para la

composición de la grasa intramuscular (Cava et al., 1997 and 1999; Ruiz et al., 1998) y para la grasa subcutánea (Díaz, García Regueiro, Casillas, & De Pedro, 1996; Flores, Biron, Izquierdo, & Nieto, 1988; Ruiz et al., 1998) en cerdos Ibéricos. El característico perfil de ácidos grasos de los animales alimentados en montanera es consecuencia del gran porcentaje de ácido oleico en la grasa de las bellotas (Tejerina et al., 2012), que son consumidas en gran cantidad (Daza et al., 2007; Lopez-Bote, 1998). Estos últimos autores también informaron de que los cerdos Ibéricos alimentados en montanera tenían mayores proporciones de MUFA y PUFA que los alimentados con una dieta basada en concentrados, coincidiendo con los resultados del presente estudio. Asimismo, Benítez et al., (2018) concluyeron que una dieta con una alta concentración de ácido oleico (similar a la alimentación de montanera) da lugar a un mayor contenido de MUFA y un menor contenido de SFA que una dieta convencional. En el presente estudio, el índice $n6/n3$ fue significativamente menor para los animales alimentados con bellota que para los alimentados con concentrado (7,3 vs 10,2, respectivamente). Estos dos valores son menores que los reportados por Domínguez and Lorenzo (2014) en la grasa dorsal del cerdo Celta, pero mayores que en la recomendación sanitaria propuesta por Simopoulos (2004). En relación con los índices IA e IT, ambos fueron significativamente menores para los cerdos de montanera que para los de cebo de campo, y estos valores para los cerdos Ibéricos de ambos sistemas fueron todos menores que los de la raza Celta, que alcanzaron alrededor de 0,5 y 1,26, respectivamente, para ambos índices (Domínguez & Lorenzo, 2014). Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, y de acuerdo con el consenso general entre los científicos y los industriales, los resultados del presente estudio apoyan los conceptos de que, de un lado, la grasa de los cerdos Ibéricos de montanera es más saludable que la de los acabados con piensos convencionales, y de otro lado, como contrapartida, los acabados en montanera tienen un mayor contenido de PUFA, lo que puede resultar en un potencialmente mayor índice oxidativo de la grasa durante el almacenamiento.

Expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico

En relación con la expresión génica, en este estudio se han identificado diferencias significativas para las expresiones de los genes SCD, ME1, ACACA, FASN, ACOX y ACLY entre estirpes y sistema de alimentación. El **gen SCD**, de la Esteroil-CoA desaturasa, enzima responsable de la biosíntesis de MUFA, principalmente ácido oleico (C18:1) a partir de la desaturación del ácido esteárico (C18:0; Lopez *et al.*, 2014), se comprobó que estaba más expresado en los cerdos Ibéricos al compararlos con cerdos Duroc puros (Benítez *et al.*, 2018) y con el cruce Duroc x Ibérico (Óvilo *et al.*, 2014). En el presente estudio, el gen SCD estaba sobreexpresado (el doble) en el genotipo Retinto (**R**) frente a los genotipos Torbiscal (**T**) y Lampiño (**L**). Aunque hay muy pocos los estudios que comparen las diferentes estirpes del cerdo Ibérico en cuanto a su expresión de genes, recientemente Villaplana-Velasco *et al.*, (2021), al comparar las estirpes Ibéricas R y T sus cruces recíprocos, encontraron que los genotipos R tenían un mayor contenido de MUFA y SFA y un perfil de expresión génica (obtenido mediante el estudio del transcriptoma muscular) compatible con un menor catabolismo de los ácidos grasos. Estany *et al.*, (2014) encontraron, en la raza Duroc, un único polimorfismo (AY487830:g.2228T > C), cuyo alelo g.2228T potenciaba la desaturación en la grasa intramuscular y subcutánea, y este efecto se asoció a una mayor expresión del gen SCD en el músculo. Estudios posteriores demostraron que esta región se encuentra actualmente segregando en la raza Duroc pero está casi fijada en la población de cerdo Ibérico (María Muñoz, García-Casco, *et al.*, 2018). Para demostrar que la expresión diferencial de SCD en el músculo de las estirpes Ibéricas no está causada por esta mutación, se secuenció la región promotora en todos los animales experimentales del presente estudio, mostrando homocigosis del alelo SCD.g.2228T en todos los animales de las tres estirpes. El gen SCD no sólo se asocia con las diferencias en la composición de ácidos grasos, sino también con el contenido total de grasa en el músculo, tal y como descubrieron Doran *et al.*, (2006), quienes demostraron que la expresión de SCD estaba correlacionada con la GIM. En cambio,

Estany *et al.*, (2014), no encontraron ninguna asociación entre la expresión del gen SCD y la deposición de grasa. Sin embargo, el presente estudio reveló una correlación positiva entre la GIM y la expresión del gen SCD ($R=0,39$; $p= 0,0016$), pero no se encontró una correlación significativa con el espesor de la grasa dorsal. Por lo tanto, el gen SCD podría ser un interesante biomarcador candidato para la deposición de GIM en el cerdo, al menos en la raza Ibérica.

En el presente estudio, el **gen FASN**, implicado en la síntesis *de novo* del ácido palmítico (C16:0), también está sobreexpresado en el genotipo R en comparación con los otros dos genotipos, pero hubo una interacción significativa entre el genotipo y el sistema de alimentación debido a la gran expresión del gen FASN únicamente en el Retinto de cebo. Zhao *et al.*, (2009) encontraron que la GIM era mayor en los cerdos que tenían una mayor expresión de los genes FASN y SCD, lo que coincide con el presente estudio, ya que el genotipo R mostró la mayor expresión de SCD y FASN y el mayor contenido de GIM. Además, Ponsuksili *et al.*, (2007), incluso al comparar unas razas magras como la German Landrace y la Pietrain, encontraron que los genes clave del metabolismo de los lípidos (FASN, ACACA, ACSL2) estaban sobrerregulados en la primera raza, mientras que los genes relacionados con el crecimiento celular, la proliferación y la síntesis de proteínas (PPARD, POU1F1, IGF2R) estaban sobrerregulados en la segunda raza, que es aún más magra. Por último, Villaplana-Velasco *et al.*, (2021) concluyeron que el genotipo Retinto tenía una elevada expresión de los genes SLC27A1 y VEGFA y que esto podría provocar una mayor deposición de grasa subcutánea e intramuscular. Un contenido suficiente de GIM es esencial para la industria del cerdo Ibérico, pero ello también tiene importantes implicaciones en la calidad de la carne de cerdo en general y, por lo tanto, se ha estudiado ampliamente para entender los factores que aumentan su deposición (Gao & Zhao, 2009).

El **gen ME1** (que codifica la enzima málica) está implicado en la síntesis *de novo* del ácido palmítico (C16:0). En el presente estudio, este gen está más expresado en Lampiño, cuya grasa dorsal, precisamente, tuvo significativamente más ácido

palmítico que las otras dos estirpes. La actividad de los genes ACACA, ME1 y FASN ha sido estudiada en las razas Ibérica y Alentejana, y se ha reportado que estos genes tienen una actividad mayor en estas razas que en otras razas modernas (Freire, Mourot, Cunha, Almeida, & Aumaitre, 1998; Palma-Granados et al., 2019). Además, Palma-Granados *et al.* (2019) y Mourot y Kouba (1998) informaron de una relación entre la expresión de ME1 y el contenido de GIM en diferentes razas, incluida la Ibérica. En el presente estudio, el Lampiño tuvo mayor expresión para el gen ME1 que el Torbiscal, sin embargo, no se encontraron diferencias en el porcentaje de GIM entre estos dos genotipos. Además, no hubo correlación entre la expresión del gen ME1 y el contenido de GIM, ni para los cerdos de montanera ni para los de cebo de campo. Sin embargo, hubo una correlación negativa significativa entre la expresión del gen ME1 y el espesor de la grasa dorsal (-0,27; $p=0,030$). Esta correlación diferencial podría tener importantes implicaciones para la industria del cerdo Ibérico y de otras razas porcinas mediante su contribución a los programas de selección genética que pretenden aumentar la grasa intramuscular y disminuir la grasa de cobertura al mismo tiempo.

El **gen ACACA** codifica la acetil-CoA carboxilasa alfa, que es esencial en la lipogénesis *de novo* y está implicada en la regulación de la β -oxidación de los ácidos grasos mitocondriales y, por tanto, en el metabolismo energético y lipídico (Diéguez, Vazquez, Romero, López, & Nogueiras, 2011; Stachowiak et al., 2013). El gen ACACA está localizado en el cromosoma SSC12, en el mismo sitio (SSC12q12-13) que un QTL que interviene en el espesor de la grasa dorsal y el peso al nacimiento (Kociucka, Cieslak, & Szczerbal, 2012; Magaña, Lin, Dooley, & Osborne, 1997). Además, varios estudios asocian el gen ACACA con el porcentaje de ácidos grasos saturados en la grasa subcutánea y/o en la grasa intramuscular (Liu et al., 2007, 2008; G. Muñoz et al., 2007; Quintanilla et al., 2011). En el presente estudio no hubo relación entre la expresión del gen ACACA y el contenido de SFA y MUFA, pero sí se correlacionó negativamente con el contenido de PUFA (-0,34; $p=0,06$). Además, Cánovas *et al.*, (2010) encontraron que el gen ACACA y otros genes implicados en la lipogénesis *de novo* estaban más

expresados en el músculo de los cerdos más pesados que en el de los más ligeros. Los resultados parcialmente contradictorios descritos anteriormente denotan que el mecanismo de regulación del gen ACACA sigue sin estar claro y depende de muchos factores. Precisamente, en lo que respecta a los factores genotipo y sistema, en el presente estudio no hubo ningún efecto del genotipo sobre la expresión del gen ACACA, pero sí del sistema de alimentación, ya que los cerdos acabados a cebo de campo tuvieron una mayor expresión de este gen.

Con respecto a los genes ACOX1 y ACLY, pocos autores han estudiado su expresión en cerdos. El **gen ACOX1** codifica la acil-CoA oxidasa, que cataliza la beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga, desempeñando así un papel esencial en la degradación de los ácidos grasos. El gen ACLY codifica la enzima ATP-citrato liasa (ACL), que proporciona energía (proveniente del ciclo de Krebs) para la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Verschuere et al., 2019). La mayoría de los estudios en los que intervienen estos dos genes son estudios de asociación con polimorfismos tipo SNPs. Por ejemplo, Zuo *et al.*, (2007) describieron un SNP para ACOX1 con frecuencias alélicas significativamente diferentes entre las razas chinas de cerdos de tipo graso y las razas occidentales de cerdos comerciales. Sus análisis de asociación mostraron que dicho SNP estaba asociado con el espesor de la grasa dorsal y el porcentaje de grasa de la canal. En el presente estudio, no hubo efecto de la estirpe en la expresión de ACOX1. En cuanto al efecto de la alimentación, en un estudio en ratones, la expresión de ACOX1 era mayor cuando se les alimentaba con una dieta alta en grasas vs una baja en grasas (J. K. Kim et al., 2004). En el presente estudio también hubo un efecto del sistema de alimentación para la expresión del gen ACOX1, con una mayor expresión en los cerdos de cebo de campo.

En cuanto al **gen ACLY**, Ren *et al.*, (2011) mostraron su efecto sobre el peso de los depósitos de grasa y otros caracteres de calidad de la carne, como el pH o la capacidad de retención de agua. En el presente estudio, ACLY estaba más expresado en el genotipo Retinto y en los cerdos de cebo de campo. Esto puede explicar en parte

por qué este genotipo tenía la grasa dorsal más gruesa. En cuanto a los perfiles de ácidos grasos de este estudio, la expresión de ACLY se correlacionó positivamente con los porcentajes de MUFA y ácido oleico, y negativamente con los porcentajes de PUFA, SFA y ácido linoleico.

El gen **EGR1** codifica un factor de transcripción de los *Dedos de Zinc*, estructuras enzimáticas implicadas en la proliferación y diferenciación de muchos tipos de células. Sin embargo, este gen no tiene un papel claro en la diferenciación de los adipocitos como el EGR2, de la misma familia de genes EGR (Boyle et al., 2009). Este autor sugirió que los genes EGR1 y EGR2 ejercen influencias opuestas en la diferenciación de los adipocitos, y que se requiere una regulación equilibrada de ambos para mantener unos niveles adecuados de adipogénesis. El EGR1 ha sido identificado como un gen candidato para la regulación de la grasa intramuscular (Wang et al., 2017). Sin embargo, (María Muñoz, García-Casco, et al., 2018) no encontraron ningún efecto de este gen sobre la deposición de GIM en cerdos Ibéricos. Asimismo, en el presente estudio, la expresión de EGR1 no se vio afectada por el genotipo, el sistema de alimentación o su interacción, y la expresión de EGR1 no se correlacionó significativamente con la GIM. Sin embargo, sí se encontró una correlación positiva (0,38; $p=0,003$) entre la expresión del gen EGR1 y el contenido de ácido oleico de la grasa subcutánea.

En relación al sistema de alimentación, en el presente estudio la mayoría de los genes lipogénicos estaban sobreexpresados en los animales de cebo de campo con respecto a los de montanera. Tejeda *et al.*, (2020) encontraron menos actividad enzimática relacionada con los genes ME1 y FASN en cerdos de montanera que en los de cebo, y sugirieron que ello se debía a una mayor ingesta energética de estos últimos; no obstante, la grasa subcutánea fue mayor en los cerdos de montanera, aunque no hubo diferencias en GIM entre los dos sistemas. En el presente estudio, a pesar de haber estudiado sólo 8 genes, se encontraron novedosas interacciones genotipo x sistema significativas para los genes ACACA ($P<0,004$), FASN ($P<0,03$) y ACLY

($P < 0,0001$), ya que hubo una gran expresión de estos genes en la estirpe Retinta en cebo de campo.

En resumen, los resultados del estudio de expresión génica del Experimento 1 sugieren la influencia de la expresión y arquitectura genética de cada estirpe (y en algunos casos la influencia de la interacción genotipo x sistema) sobre ciertos caracteres de calidad de la carne de cerdo Ibérico.

5.4. Transcriptoma muscular

El diferente número de genes diferencialmente expresados (**DEG**) en las tres comparaciones entre estirpes (LvsT, LvsR y TvsR) parece tener relación con la evolución de estos genotipos, ya que la mayor cantidad de DEG se encontró en la comparación LvsR, y precisamente tanto la estirpe Lampiña como la Retinta han estado en aislamiento reproductivo al menos desde 1986, año en el que se fundó la línea Valdesequera, que es la variedad de Retinto utilizada en el presente estudio. Así pues, es natural que se encuentren más diferencias entre estas dos estirpes y menos entre cualquiera de ellas y la Torbiscal, que se conformó como una raza sintética que incluyó ancestros de Lampiño y Retinto (Clemente et al., 2006). En la comparación TvsR se encontró el menor número de DEG, lo que indica que estas dos estirpes tienen una regulación génica similar, mientras que la estirpe Lampiña, al ser la más antigua introduce un mayor número de DEG cada vez que se incorpora en una comparación (LvsR o LvsT).

En relación con el análisis funcional, la comparación LvsR es en la que más DGE se encuentran, y sus rutas metabólicas están presentes en todos los grupos funcionales, aunque hay una mayor proporción de rutas incluidas en el grupo de metabolismo lipídico. De otro lado, en la comparación LvsT hay DEG en rutas pertenecientes a cada grupo funcional. la mayoría de los DEG detectados en la comparación TvsR son principalmente de rutas incluidas en el *grupo de desarrollo muscular*, lo que indica una clara diferencia entre el Torbiscal y el Retinto a la hora de regular genes relacionados con la acreción muscular, tanto en diferenciación muscular como a la hora de regular los mecanismos de contracción y de biosíntesis de moléculas esenciales como la miosina.

Grupo génico funcional del colágeno

De todos los genes implicados en las vías relacionadas con el colágeno, **COL3A1** es el gen que está más presente, tanto en los análisis de la plataforma *IPA* como en los de la plataforma *FATIGO*. Este gen codifica las cadenas pro-alfa 1 del colágeno de tipo III, que se encuentra principalmente como componente estructural del tejido muscular liso de órganos huecos como los vasos sanguíneos (Kuivaniemi & Tromp, 2019). Aunque está relacionado con el músculo liso, el colágeno tipo III también está ampliamente distribuido en la musculatura estriada, creando estructuras de colágeno (Bao et al., 2007), que están relacionados con los caracteres de calidad de la carne. En el presente estudio, *COL3A1* se expresó de forma diferencial en LvsT y LvsR. En ambos casos con un mayor *Log2foldchange* en la estirpe Lampiño (0,94 en LvsT y 0,63 en LvsR), interviniendo en LvsT en las rutas *GO_{bp}* denominadas “*collagen fibril organization*” (GO:0030199), “*collagen catabolic process*” (GO:0030574), así como en la ruta de la plataforma *InterPro* llamada “*collagen*” (IPR008160). En el caso de LvsR, el gen *COL3A1* se encuentra en la ruta “*collagen metabolic process*” (GO:0032963) y en la misma ruta *InterPro* que en la comparación anterior (“*Collagen*”; IPR008160). En base a estos resultados, es probable que los Lampiños tengan una mayor actividad del colágeno intramuscular, posiblemente causando una variación en los caracteres de calidad de la carne. Sin embargo, en el presente estudio no hubo diferencias entre genotipos en los análisis de textura utilizando el instrumento Warner-Bratzler. Es necesario realizar más pruebas organolépticas y de calidad de carne para comprobar si existen diferencias asociadas al colágeno entre estas estirpes, puesto que está estudiado que el colágeno juega un papel fundamental a la hora de afectar a la ternura de las piezas cárnicas, tanto en carne fresca como cocinada (Weston, Rogers, & Althen, 2002). Dado que no hubo diferencias en la comparación TvsR, podemos deducir que la expresión de *COL3A1* fue similar en Torbiscal y Retinto.

Grupo génico funcional del desarrollo muscular

De los DEGs detectados en el presente estudio, una gran parte están relacionados con este grupo, indicando una gran diferencia en la regulación del desarrollo muscular entre las tres estirpes. De entre los genes de este grupo, en este estudio se han examinado las familias de genes *SHROOM* y *MYH* por su notable grado de expresión diferencial y su presencia en un gran número de rutas. También se incluyó el gen *VEGFA* en este grupo por su implicación en las rutas relacionadas con el desarrollo muscular, pese a que su función individual no se englobe estrictamente en este grupo.

Los genes de la familia ***SHROOM*** están relacionados con el citoesqueleto de actina e implicados en mecanismos que alteran la forma de la célula al inducir una redistribución de la γ -tubulina, un regulador de la arquitectura de los microtúbulos (Hagens *et al.*, 2006). Diferentes miembros de la familia *SHROOM* afectan a la forma celular de diferentes maneras, de esta forma, el *SHROOM3* se encarga de la elongación apical y *SHROOM1* es capaz de modular la redistribución de la γ -tubulina, de este modo, *SHROOM3* acumula γ -tubulina en la superficie celular apical y *SHROOM1* acumula γ -tubulina en las uniones celulares (C. Lee, Scherr, & Wallingford, 2007). Aunque la expresión local de *SHROOM1* no está directamente relacionada con la constricción apical, los estudios de Lee, Scherr y Wallingford (2007) confirmaron que la expresión ectópica de *SHROOM1* sí está a cargo de la acumulación apical de γ -tubulina, confirmando un papel de *SHROOM1* en la regulación de la organización de los microtúbulos. Esta actividad también puede llevarse a cabo durante el desarrollo muscular, provocando un mayor rendimiento muscular en los animales con mayor expresión de este gen. En nuestro estudio, la estirpe Lampiña fue la que presentó una mayor expresión de *SHROOM1*, con un *Log2Foldchange* de 2,4 en la comparación LvsT, y de 2,0 en la comparación LvsR, en ambos casos en la ruta “*actin filament bundle assembly*” (GO:0051017). Estos resultados están en línea con los datos obtenidos de rendimiento muscular en Lampiño, que a pesar de tener el menor peso de canal, fue

la estirpe con mayor rendimiento de jamón (y mayor área ecográfica del músculo semitendinoso), aunque no hubo diferencias entre estirpes en el perímetro de jamón ni en los rendimientos de paleta y lomo (**Tabla 13**). No existen estudios en porcino que evalúen la importancia de este gen en el metabolismo muscular, por lo que se debe seguir investigando su influencia en las diferentes estirpes.

Los genes de la familia **MYH**, localizados en el cromosoma 12, se pueden distribuir en dos grupos, el grupo de genes MYH1, MYH2 y MYH4 (expresados diferencialmente en TvsR en el presente estudio), que intervienen en las rutas “*actin-myosin filament sliding*” (GO:0033275), “*actin-mediated cell contraction*” (GO:0070252) y en la ruta de InterPro “*Myosin_N*” (IPR004009), así como en las rutas canónicas detectadas en la plataforma IPA siguientes: “*Actin Cytoskeleton Signaling*”, con un z-score de 1,633 hacia el Torbiscal, y “*Skeletal and Muscular System Development and Function (Morphology of muscle)*”, sin z-score. Por otro lado, el gen MYH3 se expresó diferencialmente en LvsR y participa en las rutas “*striated muscle cell differentiation*” (GO:0051146) y “*muscle cell development*” (GO:0055001), además de en las rutas canónicas IPA “*Actin Cytoskeleton Signaling*”, como en el caso de TvsR, con un z valor de 2,840 hacia el Lampiño, y también participa este gen en la otra ruta compartida con TvsR (“*Skeletal and Muscular System Development and Function (Muscle Contraction)*”), sin z-score.

Los genes **MYH1**, **MYH2** y **MYH4** codifican el desarrollo de las fibras musculares esqueléticas de tipo IIx, IIa y IIb, respectivamente (Schiaffino & Reggiani, 1994). Estas tres isoformas forman parte de las fibras de tipo II (músculo blanco o de contracción rápida), y pueden clasificarse como de tipo oxidativo rápido (IIa) y de tipo glucolítico rápido (IIx y IIb) (Hou et al., 2015). En un estudio con cerdos Laiwu, Hou et al., (2015) informaron de una correlación positiva entre la expresión de ARNm de **MYH1** (IIa) y **MYH2** (IIx) en el músculo *Longissimus dorsi* y el color de la carne, el valor del pH, y el contenido de grasa intramuscular. En concordancia con estos hallazgos, Hou et al. (2015) encontraron una correlación positiva, pero baja, entre la expresión de **MYH2**

(fibras IIa) y la deposición de IMF en el *Longissimus thoracis* en cerdos Yorkshire. Estos autores también informaron de una correlación negativa entre la expresión de los genes *MYH1* (IIa) y *MYH4* (IIb) y el pH a las 24 horas después del sacrificio. En relación con el gen *MYH4* (fibras IIb), Kim et al., (2013) analizaron la influencia de las fibras musculares de tipo IIb en los caracteres de calidad de la carne, y concluyeron que los cerdos con mayor porcentaje de fibras IIb presentan una carne más dura, ligera y exudativa. Además, Hu et al., (2008) informaron de que la correlación entre la expresión de *MYH4* (IIb) y el contenido de grasa intramuscular fue significativamente negativa, mientras que la correlación con el test de Warner-Bratzler fue significativamente positiva.

El gen ***MYH3*** es también un gen localizado en el cromosoma 12 y codifica la *cadena pesada de miosina 3 (MYH3)*. Algunos autores han descubierto un efecto regulador de este gen sobre la composición del tipo de fibra muscular y la grasa intramuscular (I. C. Cho et al., 2019). En aquél estudio no explicaron cómo el *MYH3* influye en los genes relacionados con la adipogénesis, pero al llevar a cabo un análisis IPA de las rutas canónicas en ratones modificados para sobreexpresar la *MYH3* porcina, estos autores informaron que la vía canónica de mayor rango era una ruta de adipogénesis, con un valor p significativo. Estos autores también reportaron diferencias en la composición muscular de los ratones con mayor expresión de *MYH3*, cuyo músculo era de color rojo fuerte, con fibras oxidativas lentas de tipo I, y en los de menor expresión, cuyo músculo era de color rojo pálido, con fibras glicolíticas rápidas de tipo IIa.

En el presente estudio, la estirpe Retinta tuvo los valores de expresión más altos para *MYH3* y los más bajos para *MYH1*, *MYH2* y *MYH4*. Teniendo en cuenta los estudios anteriores, la estirpe R puede tener una mayor concentración de fibras oxidativas de tipo I de color rojo fuerte y una menor concentración de fibras glucolíticas de tipo IIb, responsable del mayor valor de color "a" obtenido en la carne de la estirpe Retinta en este estudio, lo que indica un color rojo más alto que en las otras dos estirpes, lo que

sería compatible con una tipología de fibras musculares en Retinto como la hipotética tipología recién mencionada. Aunque en el presente estudio no hubo diferencias en la GIM entre genotipos, los estudios de Villaplana-Velasco et al. (2021) reportaron un mayor contenido de GIM en Retinto que en Torbiscal, y estos resultados son compatibles con el mayor valor de expresión de *MYH3* en la estirpe Retinto encontrado en el presente estudio, y además está de acuerdo con los hallazgos de Cho et al. (2019), y puede ser una de las razones por las que el Retinto tiene valores significativamente mayores de GIM en nuestro estudio.

El gen **VEGFA**, que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), a pesar de no estar relacionado directamente con el desarrollo muscular, interviene en la comparación LvsR en las rutas “*striated muscle cell differentiation*” (GO:0051146) y “*muscle cell development*” (GO:0055001). También aparece en LvsR junto con el gen COL3A1 (ya descrito en el apartado de grupo del colágeno) en una ruta canónica de la base de datos IPA, la “*Hepatic Fibrosis Signaling Pathway*” con un z-score activado de 2,449 orientado hacia el Lampiño. Asimismo, podemos encontrarlo también en las rutas canónicas de la comparación TvsR, en “*Skeletal and Muscular System Development and Function (Morphology of muscle)*” sin z-score activado. En base a estos resultados se puede afirmar que el VEGFA es un gen que interviene en diversas funciones orgánicas diferentes con múltiples efectos. Es una molécula clave en procesos como la angiogénesis, el control de la permeabilidad vascular o la remodelación de los tejidos (Roy, Bhardwaj, & Ylä-Herttuala, 2006). Asimismo, el gen VEGFA también está implicado en el metabolismo energético y se sabe que su sobreexpresión proporciona protección frente a la hipoxia inducida por la obesidad y la resistencia a la insulina (Elias et al., 2012). Una mayor expresión de este gen se asocia con un mayor contenido de grasa en distintas variedades de cerdo (Villaplana-Velasco et al., 2021). Además, los experimentos con ratones confirmaron que el VEGFA provoca cambios morfológicos en los adipocitos de los tejidos adiposos (Lu et al., 2012). Estos autores reportaron que la sobreexpresión de VEGFA tuvo sus efectos sobre todo en el tejido adiposo blanco, aumentando la termogénesis como resultado

de un "pardeamiento" del tejido adiposo blanco sin cambios en los depósitos de tejido adiposo marrón. Todos estos resultados sugieren claramente un papel potencial del VEGFA en la diferenciación y función del tejido adiposo pardo (Elias, Franckhauser, & Bosch, 2013; Lu et al., 2012). De estos estudios podemos deducir, que cuanto más altos sean los valores de expresión de VEGFA mayor será la resistencia a la obesidad y, por tanto, menor será el peso corporal.

Esta información sobre el gen VEGFA se puede aplicar al presente estudio, en el que la estirpe Lampiña tuvo un mayor valor de expresión de VEGFA y un menor peso corporal que la estirpe Torbiscal. Sin embargo, la estirpe Retinta también tuvo valores de expresión de VEGFA más altos que la Torbiscal, pero sin diferencias en el peso corporal entre estas dos estirpes. En este caso, la diferencia de tamaño (altura y longitud) entre estas tres estirpes puede estar jugando un papel decisivo a la hora de enmascarar posibles reducciones de peso por medio de este gen. De esta forma, el Lampiño sigue siendo la estirpe con menor deposición grasa dorsal, significativamente diferente del Torbiscal, que es la estirpe con mayor cobertura grasa, y, por otra parte, el Retinto, al tener un valor de VEGFA también alto tuvo valores intermedios entre las otras dos estirpes. Por lo tanto, podemos concluir que hay más factores diferenciales que están afectando al peso corporal en estas estirpes aparte de la expresión de VEGFA, sin embargo, este gen podría estar relacionado más estrechamente con la deposición de grasa dorsal, ya que se ajustan mejor sus cambios de espesor a los resultados de expresión.

Grupo génico funcional del metabolismo de los lípidos:

En este grupo se encontraron muchos DEGs que intervienen en muchas rutas distintas. El presente estudio se centró en FADS2 y FABP4 por ser los que más relación tienen con los Experimentos 1 y 2.

El gen **FADS2** codifica la enzima desaturasa de ácidos grasos 2 (FADS2), implicada en el metabolismo de los PUFA. Esta enzima se encarga del paso limitante de la desaturación del ácido linoleico, un ácido graso esencial. Tras esto, se realiza una secuencia de elongación y desaturación para conseguir PUFAs de cadena larga como el ácido araquidónico, el ácido eicosapentanoico (EPA) o el ácido docosahexanoico (DHA) (Gol, Pena, Rothschild, Tor, & Estany, 2018; Sprecher, Luthria, Mohammed, & Baykousheva, 1995). Otros autores también coinciden en que los genes de la familia FADS están asociados a los niveles de ácidos grasos en los fosfolípidos séricos y que se encargan de la regulación de los PUFA de cadena larga (Lattka, Illig, Koletzko, & Heinrich, 2010). En cerdos, este gen está codificado en el cromosoma 2 (2:9632454-9667044:-1) como parte de un clúster que incluye a FADS1 y FADS3 (Gol et al., 2018). Este gen se ha asociado con el contenido de C20:4 y la GIM (Renaville et al., 2013). Estos resultados también fueron validados en experimentos con ratones, en los que comprobaron que ratones sin FADS2 son incapaces de sintetizar PUFA de cadena larga (20:4, 22:6, 24:5, etc.) o de sintetizar componentes de membrana relacionados con los PUFA (Stoffel et al., 2008). Otros estudios también han demostrado que las diferentes mutaciones en FADS1 y FADS2 están relacionadas con una composición diferente de ácidos grasos (en particular, PUFA de cadena larga) en la membrana de los eritrocitos (Rzehak et al., 2009).

En el presente estudio, el gen FADS2 sólo se expresó de forma diferencial en la comparación entre Lampiño y Retinto, con un Log2FoldChange de 0,96 y apareció en la ruta GO_{bp} “fatty acid biosynthetic process” (GO:0006633) y en la InterPro “Fatty_acid_desaturase-1” (IPR005804). También aparece en una ruta canónica según

el IPA llamada "*Oleate Biosynthesis II (Animals)*" sin z-score. Estos hallazgos pueden explicar los mayores valores de PUFA de la estirpe Lampiña obtenidos en el Experimento 1. Debido a la función limitante de esta enzima, una mayor expresión de FADS2 significa un aumento en el número de ácidos grasos ω -6 desaturados y, por tanto, una mayor síntesis de PUFA.

El gen **FABPs** codifica las *proteínas de unión a ácidos grasos* (FABPs), que son miembros de la superfamilia de proteínas de unión a lípidos. Se han identificado 9 de estas FABP diferentes, denominadas según su distribución específica en los tejidos: L (hígado), I (intestinal), H (músculo y corazón), A (adipocito), E (epidérmico), Il (ileal), B (cerebro), M (mielina) y T (testículo) (Chmurzyńska, 2006). El papel principal de las proteínas de la familia FABP es la regulación de la captación de ácidos grasos y el transporte intracelular, sin embargo, el gen FABP4 fue mapeado en el cromosoma 6 en los cerdos, y la región cromosómica del gen fue sugerida como un QTL para él (Chmurzyńska, 2006; S. Cho et al., 2008; De Koning et al., 1999). El gen de la *proteína de unión a ácidos grasos 4* (FABP4) bovina se asocia significativamente con la presencia de grasa intramuscular macroscópica y el espesor de la grasa subcutánea en los cruces Wagyu x Limousin F2 (S. Cho et al., 2008; Michal, Zhang, Gaskins, & Jiang, 2006). La FABP4 porcina fue aislada y secuenciada para estudiar el papel de la A-FABP en la diferenciación de la acumulación de GIM en los cerdos Duroc, y se confirmó que estaba implicada en la regulación de la acumulación de grasa intramuscular en estos cerdos (Gerbens et al., 1998). Sin embargo, en nuestro estudio, la estirpe Lampiña, con el mayor valor de expresión para FABP4 es la que tuvo el menor valor de GIM. Entre las estirpes Retinta y Torbiscal, con valores más altos de GIM, no hubo diferencias en la expresión de FABP4 entre ellas, y la Retinta tuvo valores de expresión de FABP4 más bajos que la Lampiña. En definitiva, podemos afirmar que hay más genes o factores importantes implicados en la deposición de la GIM en el cerdo Ibérico con más importancia que el gen FABP4.

Genes de factores reguladores

El gen *TNF* codifica el TNF (factor de necrosis tumoral). En los análisis de reguladores de la base de datos IPA se ha observado que el gen TNF estaba significativamente activado en dos de las comparaciones entre estirpes. Aunque el TNF es una citoquina inflamatoria e inmunomoduladora expresada induciblemente por macrófagos activados, monocitos, neutrófilos, células T y células NK (Tian, Nowak, & Brasier, 2005), hay estudios que han informado de un importante desequilibrio alélico del TNF en los depósitos de grasa y en el músculo esquelético en diferentes razas de cerdos (Polish Large White, Polish Landrace, Pietrain y Duroc), localizándose este desequilibrio principalmente en la grasa visceral (Stachowiak y Flisikowski, 2019). Para estos autores, el TNF ha sido valorado como un buen gen candidato para la investigación, como un potencial objetivo molecular para la modulación de la deposición grasa en el cerdo (Stachowiak & Flisikowski, 2019). En relación con nuestros resultados, utilizando el software IPA, se detectaron dos redes reguladoras en LvsR y LvsT, ambas activadas para la estirpe L con 2,485 y 2,060 respectivamente (**Tabla 19**). Pero no se detectaron observaciones relacionadas con el TNF en TvsR. A la luz de estos resultados, podemos afirmar que las estirpes T y R tienen una actividad de TNF similar, mientras que la expresión de TNF de la estirpe L está mucho más activada. Al comprobar los resultados fenotípicos (**Tabla 13**) la estirpe L fue también la estirpe con el menor espesor de la capa interna de la grasa dorsal, teniendo las estirpes T y R espesores mayores. Estos resultados pueden apoyar la posible implicación del TNF en los caracteres de grasa, propuesta por Stachowiak y Flisikowski (2019). En el presente estudio, el software IPA también reveló una red de regulación del TNF en LvsR, en la que el TNF está regulando varios genes implicados en la fibrogénesis (**Figura 45**), como el ACTA1 y el ACTA2 en la comparación LvsR, que juegan un papel fundamental en función muscular, y coincidiría con los mayores valores de rendimiento muscular del Lampiño pese a su menor tamaño comparado con las otras dos estirpes.

6. Conclusiones/Conclusions

6.1. Conclusiones

1. Antes de iniciar la fase de acabado, ya se observaron diferencias importantes entre las estirpes Ibéricas, así la estirpe **Torbiscal** presentó lomos de mayor diámetro y área, La estirpe **Lampiña** presentó un mayor espesor de la capa interna de la grasa dorsal, indicando una madurez más precoz, y la estirpe **Retinta** mostró un mayor espesor de la capa media de grasa dorsal, lo que indica un mayor grado de adipogénesis.
2. Antes de iniciar la fase de acabado, también se observaron diferencias significativas en la bioquímica sanguínea, así los niveles de urea y triglicéridos en sangre fueron más altos en la estirpe **Lampiña**, lo que sugiere que estos animales pueden necesitar dietas con una menor cantidad de proteína.
3. Durante la fase de acabado, el tejido graso creció más que el tejido muscular, siendo proporcionalmente el espesor de la capa media de la grasa dorsal la capa que más creció independientemente del sistema de acabado o la estirpe.
4. Durante la fase de acabado, se observaron interacciones significativas entre genotipo y sistema de alimentación que fueron debidas a la estirpe **Torbiscal**, porque presentó un incremento de la deposición grasa mucho mayor en el cebo de montanera que en el de campo.
5. Tras el acabado, los espesores de la grasa dorsal, en sus tres capas, y de la grasa sobre el músculo semitendinoso, fueron mayores en los animales de montanera que en los de cebo de campo.
6. Tras el acabado, se observaron diferencias en la acreción muscular debidas al genotipo, ya que los **Retintos** presentaron mayor profundidad del glúteo y los **Lampiños** mayor área del semitendinoso; y también debidas al sistema de acabado, pues los animales tuvieron un mayor área del semitendinoso en el sistema de montanera y una mayor profundidad del lomo en el sistema de cebo de campo.
7. Tras el acabado, los valores sanguíneos de urea, triglicéridos, lactato y glucosa estaban más aumentados en los animales de cebo de campo. Esta diferencia se debe principalmente a la mayor concentración de proteína en la dieta, basada en pienso, y al menor ejercicio físico, ambos del sistema de cebo de campo.

8. La estirpe **Retinta** tuvo la mayor proporción de oleico y la menor proporción de SFA, por tanto, aunque esta estirpe tenga un mayor grado de adipogénesis, su grasa tiene unas características más saludables que la de las otras estirpes.
9. Los animales acabados en montanera tuvieron una mayor proporción de MUFA y PUFA y menor contenido en SFA en la grasa subcutánea que los animales de cebo de campo, corroborando así que de los animales de montanera se obtienen productos cárnicos más saludables.
10. La mayor expresión del gen SCD en la estirpe **Retinta** podría explicar el contenido significativamente mayor de MUFA en esta estirpe.
11. Los genes ME, ACACA, FASN, ACOX y ACLY estaban sobre-expresados en los animales de cebo de campo, lo que indica una activación del metabolismo lipídico en este sistema, que coincide además con un aumento de los valores de urea, triglicéridos, lactato y glucosa en sangre.
12. La comparación del número de genes diferencialmente expresados entre Retinto y Torbiscal (125) y entre Retinto y Lampiño (676) indica mayor similitud entre Retinto y Torbiscal que entre Retinto y Lampiño en cuanto a expresión génica.
13. Las rutas funcionales génicas relacionadas con el colágeno sólo aparecen en las comparaciones Lampiño versus Retinto y Lampiño versus Torbiscal, con una sobreexpresión en la estirpe **Lampiña**, lo que puede indicar que esta estirpe tiene un metabolismo del colágeno más activado que las otras dos estirpes.
14. La estirpe **Retinta** tuvo la mayor expresión del gen *MYH3* y la menor expresión de los genes *MYH1*, *MYH2* y *MYH4*, lo que explicaría la tendencia a una mayor proporción de grasa intramuscular y la significativamente mayor proporción de fibras musculares de tipo oxidativo I, y por tanto el color más rojizo de la carne determinados en esta estirpe. Por otra parte, la estirpe **Lampiña** tuvo la mayor expresión de *FADS2*, lo que podría estar relacionado con el valor significativamente mayor de PUFAs hallado en esta estirpe.

6.2. Conclusions

1. Before finishing, important differences were observed among the Iberian strains: the Torbiscal showed the thickest loins, the Lampiño showed the larger back fat inner layer, indicating an early maturity, and the Retinta showed the larger back fat middle layer, indicating a higher adipogenesis in this strain.
2. Before finishing, significant differences in blood parameters were observed, with levels of urea and triglyceride being higher in the Lampiña strain, suggesting that these animals may require lower protein in the diet than the other strains.
3. During the finishing, fat tissue grew at a greater rate than muscle tissue, and the thickness of middle layer of the subcutaneous back fat increased more than the other layers irrespectively of the strain or system.
4. During the finishing, significant interactions were observed between genotype and feeding system mainly due to the Torbiscal strain, because it had significantly higher fat deposition rate (in all fat depots) in the montanera (free-range acorn feeding) system than in the concentrate-based (“cebo de campo”) system.
5. After finishing, the thickness of the backfat (in its three layers) and the thickness of the fat over the semitendinosus muscle, were greater in the montanera system than in the cebo de campo system.
6. During finishing, differences were observed in muscle accretion due to genotype, with the Retinto strain having the greatest gluteal depth and Lampiños having the greatest semitendinosus area, and also due to the system, because pigs had greater semitendinosus area in the montanera system and greater loin thickness in the cebo de campo fattening system.
7. After finishing, blood levels of urea, triglycerides, lactate and glucose were greater in the animals finished in the cebo de campo system. This difference is mainly due to the higher protein concentration in the diet and the lower physical exercise of the cebo de campo system.

8. The Retinta strain had the highest proportion of oleic acid and the lowest proportion of SFA. Therefore, this genotype had a greater adipogenic trait but its fat exhibits healthier characteristics than the fat from the other two strains.
9. The animals finished in montanera had a higher proportion of MUFA and PUFA and a lower SFA content in the subcutaneous fat than the animals from the cebo de campo system, thus confirming that the animals from the montanera system yield healthier meat products.
10. The higher expression of the SCD gene in the Retinta strain could explain the significantly higher MUFA content in these animals.
11. The ME, ACACA, FASN, ACOX and ACLY genes were overexpressed in the animals finished in the cebo de campo system, indicating an activation of lipid metabolism in this system, which also coincides with an increase in urea, triglycerides, lactate and glucose blood levels.
12. The comparison of the number of differentially expressed genes between Retinto and Torbiscal (125) and between Retinto and Lampiño (676) indicates higher similarity between Retinto and Torbiscal than between Retinto and Lampiño in terms of gene expression.
13. The gene functional pathways related to collagen only appear in the comparisons Lampiño vs Retinto and Lampiño vs Torbiscal, with an overexpression in the Lampiño strain, which may indicate that this strain has a more activated collagen metabolism than the other two strains.
14. The Retinta strain had the highest expression of the MYH3 gene and the lowest expression of the MYH1, MYH2 and MYH4 genes, which may explain the trend for a greater intramuscular fat content and the higher proportion of oxidative type I muscle fibres, and therefore the more reddish meat determined for this strain. On the other hand, the Lampiña strain had the highest expression of FADS2, which could be related to the significantly higher PUFA content found for this latter strain.

7. Referencias

Referencias

- Almeida, J. M., Bressan, M. C., Amaral, A. J., Bettencourt, C., Santos-Silva, J., Moreira, O., & Gama, L. T. (2019). Body weight and ultrasound measurements over the finishing period in Iberian and F1 Large White × Landrace pigs raised intensively or in free-range conditions. *Livestock Science*, 229(April), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.09.020>
- Amills, M., Clop, A., Ramírez, O., & Pérez-Enciso, M. (2010). Origin and Genetic Diversity of Pig Breeds. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022884>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Anderson, D. B., Kauffman, R. G., & Kastenschmidt, L. L. (1972). Lipogenic enzyme activities and cellularity of porcine adipose tissue from various anatomical locations. *Journal of Lipid Research*, 13(5), 593–599. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39365-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39365-2)
- Andrés, A. I., Cava, R., Mayoral, A. I., Tejada, J. F., Morcuende, D., & Ruiz, J. (2001). Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre. *Meat Science*, 59(1), 39–47. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00050-X)
- Aparicio Sanchez, G. (1944). *Zootecnia Especial : Etnología compendiada. 2ª Ed (2º)*. Córdoba.
- Astiz, C. S., & Alfranca, I. S. (1998). Razas porcinas en peligro mejoradoras de la calidad de la carne: El Negro Lampiño. *Archivos de Zootecnia*, 47(178), 417–424.
- Ayuso, D., González, A., Hernández, F., Corral, J. M., & Izquierdo, M. (2013). Prediction of carcass composition, ham and foreleg weights, and lean meat yields of Iberian pigs using ultrasound measurements in live animals. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1884–1892. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5357>
- Ayuso, D., González, A., Hernández, F., Peña, F., & Izquierdo, M. (2014). Effect of sex and final fattening on ultrasound and carcass traits in Iberian pigs. *Meat Science*, 96(1), 562–567.
- Ayuso, D., González, A., Peña, F., Hernández-García, F. I., & Izquierdo, M. (2020). Effect of fattening period length on intramuscular and subcutaneous fatty acid profiles in Iberian pigs finished in the Montanera sustainable system. *Sustainability (Switzerland)*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/SU12197937>
- Ayuso, M., Fernández, A., Núñez, Y., Benítez, R., Isabel, B., Fernández, A. I., ... Óvilo,

- C. (2016a). Developmental stage, muscle and genetic type modify muscle transcriptome in pigs: Effects on gene expression and regulatory factors involved in growth and metabolism. *PLoS ONE*, *11*(12), 167858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167858>
- Ayuso, M., Fernández, A., Núñez, Y., Benítez, R., Isabel, B., Fernández, A. I., ... Óvilo, C. (2016b). Developmental Stage, Muscle and Genetic Type Modify Muscle Transcriptome in Pigs: Effects on Gene Expression and Regulatory Factors Involved in Growth and Metabolism. *PLOS ONE*, *11*(12), e0167858. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167858>
- Bao, X., Zeng, Y., Wei, S., Wang, G., Liu, C., Sun, Y., ... Li, H. (2007). Developmental Changes of Col3a1 mRNA Expression in Muscle and Their Association with Intramuscular Collagen in Pigs. *Journal of Genetics and Genomics*, *34*(3), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60023-X](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60023-X)
- Barea, R., Isabel, B., Nieto, R., López-Bote, C., & Aguilera, J. F. (2013). Evolution of the fatty acid profile of subcutaneous back-fat adipose tissue in growing Iberian and Landrace × Large White pigs. *Animal*, *7*(4), 688–698. <https://doi.org/10.1017/S175173111200184X>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, *98*(6), 236. <https://doi.org/10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304340>
- Benítez, R., Fernández, A., Isabel, B., Núñez, Y., De Mercado, E., Gómez-Izquierdo, E., ... Óvilo, C. (2018). Modulatory effects of breed, feeding status, and diet on adipogenic, lipogenic, and lipolytic gene expression in growing iberian and duroc pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms19010022>
- Benítez, R., Trakooljul, N., Núñez, Y., Isabel, B., Murani, E., De Mercado, E., ... Óvilo, C. (2019). Breed, diet, and interaction effects on adipose tissue transcriptome in iberian and duroc pigs fed different energy sources. *Genes*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/genes10080589>
- Benito, J., Vázquez, C., Menaya, C., Ferrera, J. L., García Casco, J. M., Silió, L., ... Rodríguez, M. C. (2000). Evaluation of the productive parameters in different strains of Iberian pig. *Tradition and Innovation in Mediterranean Pig Production (JA Afonso & JL Tirapicos, Eds)*. CIHEAM/ICAM-UE, Zaragoza, 113–121.
- Boyle, K. B., Hadaschik, D., Virtue, S., Cawthorn, W. P., Ridley, S. H., O’Rahilly, S., & Siddle, K. (2009). The transcription factors Egr1 and Egr2 have opposing influences on adipocyte differentiation. *Cell Death and Differentiation*, *16*(5), 782–789. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.11>
- Bressan, M. C., Belo, A. T., Amaral, A., Cordeiro, D., Boari, C. A., Bettencourt, C., ... Almeida, J. M. (2021). The impact of genetic groups (Alentejano and F1 Landrace

- x Large White pigs) and body weight (90, 120 and 160 kg) on blood metabolites. *Livestock Science*, 255(December 2021), 104810. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104810>
- Bunnik, E. M., & Le Roch, K. G. (2013). An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Advances in Wound Care*, 2(9), 490–498. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2012.0379>
- Buxadé Carbó, C. (1984). Capítulo III. “Las Razas Porcinas Autóctonas Españolas.” In *Ganado Porcino. Sistema de Explotación y Técnicas* (Mundi Pren, p. 640). Madrid.
- Cánovas, A., Quintanilla, R., Amills, M., & Pena, R. N. (2010). Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-372>
- Cantos, E., Espín, J. C., López-Bote, C., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (*Quercus* spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6248–6255. <https://doi.org/10.1021/jf030216v>
- Carey, G. B. (1997). The swine as a model for studying exercise-induced changes in lipid metabolism. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29(11), 1437–1443. <https://doi.org/10.1097/00005768-199711000-00008>
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Effect of α -tocopheryl acetate supplementation and the extensive feeding of pigs on the volatile aldehydes during the maturation of Iberian ham. *Food Science and Technology International*, 5(3), 235–241. <https://doi.org/10.1177/108201329900500306>
- Cava, Ramón, Estévez, M., Ruiz, J., & Morcuende, D. (2003). Physicochemical characteristics of three muscles from free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live weight. *Meat Science*, 63(4), 533–541. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00180-8)
- Cava, Ramón, Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., & Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the iberian pig. *Meat Science*, 45(2), 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00102-7)
- Chmurzyńska, A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*. J Appl Genet. <https://doi.org/10.1007/BF03194597>
- Cho, I. C., Park, H. B., Ahn, J. S., Han, S. H., Lee, J. B., Lim, H. T., ... Lee, J. W. (2019). A functional regulatory variant of MYH3 influences muscle fiber-type composition

- and intramuscular fat content in pigs. *PLoS Genetics*, 15(10), e1008279. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008279>
- Cho, S., Tae, S. P., Yoon, D. H., Hyun, S. C., Namgoong, S., Byung, L. P., ... Hyung, D. S. (2008). Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 41(1), 29–34. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.1.029>
- Chu, Y., & Corey, D. R. (2012). RNA Sequencing: Platform Selection, Experimental Design, and Data Interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 22(4), 271. <https://doi.org/10.1089/NAT.2012.0367>
- Clemente, I., Membrillo, a., Azor, P., Dorado, G., Rodero Franganillo, A., & Molina Casanova, A. (2006). Algunas consideraciones sobre las diferentes clasificaciones del tronco porcino ibérico: una propuesta integradora. *Solo Cerdo Ibérico*, 18(16), 7–23. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4381812>
- Clemente, I., Membrillo, A., Azor, P. J., Polvillo, O., Juárez, M., Santos, E., ... Molina, A. (2008). Caracterización de la diversidad genética intrarracial del cerdo Ibérico. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 104(2), 314–322.
- Clemente, I., O., P., M., J., C., A., A., M., A., H., ... A., M. (2012). Comparison of pork quality from pure and crossbred Iberian pig. *Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterranean Seminars*, 101, 441–446. Retrieved from <http://om.ciheam.org/om/pdf/a101/00006724.pdf>
- Coma, J., Zimmerman, D. R., & Carrion, D. (1995). Relationship of rate of lean tissue growth and other factors to concentration of urea in plasma of pigs. *Journal of Animal Science*, 73(12), 3649–3656. <https://doi.org/10.2527/1995.73123649X>
- Corney, D. C. (2013). RNA-seq Using Next Generation Sequencing. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/MM.EN.3.203>
- Daza, A., Mateos, A., Ovejero, I., Rey, A. I., & López Bote, C. J. (2005). Validity of body composition measurements in vivo obtained using ultrasound in Iberian pigs. *ITEA (Información Técnica Económica Agraria). Producción Animal (España)*.
- Daza, A., Mateos, A., Rey, A. I., Ovejero, I., & López-Bote, C. J. (2007). Effect of duration of feeding under free-range conditions on production results and carcass and fat quality in Iberian pigs. *Meat Science*, 76(3), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.004>
- De Koning, D. J., Janss, L. L. G., Rattink, A. P., Van Oers, P. A. M., De Vries, B. J., Groenen, M. A. M., ... Van Arendonk, J. A. M. (1999). Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 152(4), 1679–1690. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.4.1679>

- Dean, H. K., & Hilditch, T. P. (1933). The body fats of the pig. *Biochemical Journal*, 27(6), 1950–1956. <https://doi.org/10.1042/bj0271950>
- Del Estado, J. (2014). Disposición 2220 del BOE núm. 52 de 2014. Retrieved from <http://www.boe.es>
- Delgado, J. V, Barba, C., Diéguez, E., & Cañuelo, P. (2000). Caracterización exteriorista de las variedades del cerdo ibérico basada en caracteres cualitativos. *Archivos de Zootecnia*, 49(186), 201–207.
- Díaz, I., García Regueiro, J. A., Casillas, M., & De Pedro, E. (1996). Triglyceride composition of fresh ham fat from Iberian pigs produced with different systems of animal nutrition. *Food Chemistry*, 55(4), 383–387. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00140-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00140-9)
- Diéguez, C., Vazquez, M. J., Romero, A., López, M., & Nogueiras, R. (2011). Hypothalamic control of lipid metabolism: Focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology*, 94(1), 1–11. <https://doi.org/10.1159/000328122>
- Dieguez, E. (2000a). La raza porcina ibérica. *Solo Cerdo Ibérico*, 5(Octubre), 7–24.
- Dieguez, E. (2000b). La raza porcina ibérica. *Solo Cerdo Ibérico*, 5(Octubre), 7–24. <https://doi.org/ISSN 2254-4240>
- Domínguez, R., & Lorenzo, J. M. (2014). Effect of genotype on fatty acid composition of intramuscular and subcutaneous fat of Celta pig breed. *Grasas y Aceites*, 65(3). <https://doi.org/10.3989/gya.0234141>
- Doran, O., Moule, S. K., Teye, G. A., Whittington, F. M., Hallett, K. G., & Wood, J. D. (2006). A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *British Journal of Nutrition*, 95(3), 609–617. <https://doi.org/10.1079/bjn20051526>
- Dove, C. R., & Alworth, L. C. (2015). Blood collection from the orbital sinus of swine. *Lab Animal*, 44(10), 383–384. <https://doi.org/10.1038/LABAN.869>
- Duran-Montgé, P., Theil, P. K., Lauridsen, C., & Esteve-Garcia, E. (2009). Dietary fat source affects metabolism of fatty acids in pigs as evaluated by altered expression of lipogenic genes in liver and adipose tissues. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 3(4), 535.
- Elias, I., Franckhauser, S., & Bosch, F. (2013). New insights into adipose tissue VEGF-A actions in the control of obesity and insulin resistance. *Adipocyte*, 2(2), 109–112. <https://doi.org/10.4161/adip.22880>
- Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., ... Bosch, F. (2012). Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects

- against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *61*(7), 1801–1813. <https://doi.org/10.2337/db11-0832>
- Estany, J., Ros-Freixedes, R., Tor, M., & Pena, R. N. (2014). A functional variant in the stearoyl-CoA desaturase gene promoter enhances fatty acid desaturation in pork. *PLoS ONE*, *9*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086177>
- Estévez, M., Morcuende, D., & Cava López, R. (2003). Physico-chemical characteristics of M. Longissimus dorsi from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live-weight and commercial pigs: A comparative study. *Meat Science*, *64*(4), 499–506. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00228-0)
- Estévez, M., Morcuende, D., & Cava, R. (2003). Oxidative and colour changes in meat from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live weight and from industrial pig during refrigerated storage. *Meat Science*, *65*(3), 1139–1146. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00343-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00343-1)
- Fernández-Fígares, I., Lachica, M., Nieto, R., Rivera-Ferre, M. G., & Aguilera, J. F. (2007). Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livestock Science*, *110*(1–2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.10.002>
- Flores, J., Biron, C., Izquierdo, L., & Nieto, P. (1988). Characterization of green hams from Iberian pigs by fast analysis of subcutaneous fat. *Meat Science*, *23*(4), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(88\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(88)90010-1)
- Flowers, M. T., & Ntambi, J. M. (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, *19*(3), 248.
- Folch, J., Lees, M., Sloane, S. G. H., Folch, J., & Lees, M., & Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497.
- Folin, O. (1905). A THEORY OF PROTEIN METABOLISM. <https://doi.org/10.1152/Ajplegacy.1905.13.2.117>, *13*(2), 117–138. <https://doi.org/10.1152/AJPLEGACY.1905.13.2.117>
- Font-i-Furnols, M., García-Gudiño, J., Izquierdo, M., Brun, A., Gispert, M., Blanco-Penedo, I., & Hernández-García, F. I. (2021). Non-destructive evaluation of carcass and ham traits and meat quality assessment applied to early and late immunocastrated Iberian pigs. *Animal*, *15*(4), 100189. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2021.100189>
- Fortin, A. (1986). Development of backfat and individual fat layers in the pig and its relationship with carcass lean. *Meat Science*, *18*(4), 255–270. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(86\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(86)90016-1)
- Freire, J. P. B., Mourot, J., Cunha, L. F., Almeida, J. A. A., & Aumaitre, A. (1998). Effect

- of the Source of Dietary Fat on Postweaning Lipogenesis in Lean and Fat Pigs. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 42(2), 90–95.
<https://doi.org/10.1159/000012722>
- Fritz, I. B., & McEwen, B. (1959). Effects of carnitine on fatty-acid oxidation by muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 129(3345), 334–335.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.129.3345.334>
- Gao, S.-Z., & Zhao, S.-M. (2009). Physiology, affecting factors and strategies for control of pig meat intramuscular fat. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(1), 59–74. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653527>
- García-Gudiño, J., Izquierdo, M., Ayuso, D., Del Rosario, A. I., Duarte, J. L., Pérez, M. A., & Hernández-García, F. I. (2013). Effect of pre-slaughter weight and sex on commercial meat cut yields of Iberian pigs. In M. Čandek-Potokar, M. Prevolnik-Povše, N. Batorek-Lukač, & M. Skrlep (Eds.), *8th International Symposium on the Mediterranean Pig* (pp. 101–104). Ljubljana, Slovenia.: Biotechnical Faculty University of Ljubljana. Retrieved from ISSN 1854-4819
- García-Gudiño, Javier, Blanco-Penedo, I., Font-I-furnols, M., Angón, E., & Perea, J. M. (2021). Analysis of the sustainability of fattening systems for iberian traditional pig production through a technical and environmental approach. *Animals*, 11(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani11020411>
- García-Gudiño, Javier, Blanco-Penedo, I., Gispert, M., Brun, A., Perea, J., & Font-i-Furnols, M. (2021). Understanding consumers' perceptions towards Iberian pig production and animal welfare. *Meat Science*, 172, 108317.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108317>
- García-Regueiro, J. A., Rius, M. A., & Díaz, I. (1995). Evaluation of boar taint compounds in vapour phase by head space techniques coupled to capillary GC–MS. *Proceedings of EAAP Working Group: Production and Utilization of Meat from Entire Male Pigs, Milton Keynes, UK, INRA and MLC*.
- Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2008). *Biochemistry*. Cengage Learning. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=iGPsen3fSOIC>
- Gerbens, F., Jansen, A., Van Erp, A. J. M., Harders, F., Meuwissen, T. H. E., Rettenberger, G., ... Te Pas, M. F. W. (1998). The adipocyte fatty acid-binding protein locus: Characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mammalian Genome*, 9(12), 1022–1026.
<https://doi.org/10.1007/s003359900918>
- Gol, S., Pena, R. N., Rothschild, M. F., Tor, M., & Estany, J. (2018). A polymorphism in the fatty acid desaturase-2 gene is associated with the arachidonic acid metabolism in pigs. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32710-w>

- Grzes, M., Sadkowski, S., Rzewuska, K., Szydlowski, M., & Switonski, M. (2016). Pig fatness in relation to FASN and INSIG2 genes polymorphism and their transcript level. *Molecular Biology Reports*, 43(5), 381–389. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3969-z>
- Guillevic, M., Kouba, M., & Mourot, J. (2009). Effect of a linseed diet or a sunflower diet on performances, fatty acid composition, lipogenic enzyme activities and stearoyl-CoA-desaturase activity in the pig. *Livestock Science*, 124(1–3), 288–294.
- Hagens, O., Ballabio, A., Kalscheuer, V., Kraehenbuhl, J. P., Schiaffino, M. V., Smith, P., ... Wallingford, J. B. (2006, April 4). A new standard nomenclature for proteins related to Apx and Shroom. *BMC Cell Biology*. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-18>
- Hausman, G. J., Wright, J. T., Dean, R., & Richardson, R. L. (1993). Cellular and Molecular Aspects of the Regulation of Adipogenesis1. *Journal of Animal Science*, 71(suppl_2), 33–55. https://doi.org/10.2527/1993.71Supplement_233s
- Henry, Y. (1977). *Développement morphologique et métabolique du tissu adipeux chez le porc : influence de la sélection, de l'alimentation et du mode d'élevage*. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* (Vol. 17). Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00897237>
- Hou, Y., Jing, L., Zhao, Y., Wang, S., Liu, A., Zhao, S., & Li, X. (2015). Identification of genome regions and important variations associated with expression level of *MYH* genes and its correlation with meat quality traits in pigs. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2(3), 237–241. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2015057>
- Houten, S. M., & Wanders, R. J. A. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(5), 469. <https://doi.org/10.1007/S10545-010-9061-2>
- Hu, H. M., Wang, J. Y., Zhu, R. S., Guo, J. F., & Wu, Y. (2008). Effect of myosin heavy chain composition of muscles on meat quality in Laiwu pigs and Duroc. *Science in China, Series C: Life Sciences*, 51(2), 127–132. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0016-x>
- Ibáñez-Escriche, N., Magallón, E., Gonzalez, E., Tejeda, J. F., & Noguera, J. L. (2016). Genetic parameters and crossbreeding effects of fat deposition and fatty acid profiles in Iberian pig lines. *Journal of Animal Science*, 94(1), 28–37.
- Ibáñez-Escriche, N., Varona, L., Magallón, E., & Noguera, J. L. (2014). Crossbreeding effects on pig growth and carcass traits from two Iberian strains. *Animal*, 8(10), 1569–1576.
- Izquierdo, M. (2007). El ultrasonido, una alternativa para mejorar el rendimiento

- cárnico sin reducir la calidad de los productos derivados del cerdo ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico*, (18), 9–15.
- Izquierdo, M., Hernández-García, F. I., Garrido, N., García-Gudiño, J., Matías, J., Cuadrado, I., & Pérez, M. A. (2018). Changes in carcass and meat traits during the montanera finishing period of Iberian pigs. In *69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science* (p. 500). Dubrovnik: Wageningen Academic Publisher. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-871-1>
- Izquierdo, M., Hernández-García, F. I., Lopez-Parra, M., Del Rosario, A. I., Montero, A., Pérez, M. A., ... Garrido, N. (2018). Carcass and meat traits of different iberian pig genotypes fed in a traditional extensive system. *Archivos de Zootecnia*, 67, 201–204. <https://doi.org/10.21071/AZ.V67ISUPPLEMENT.3604>
- Juárez, M., Clemente, I., Polvillo, O., & Molina, A. (2009). Meat quality of tenderloin from Iberian pigs as affected by breed strain and crossbreeding. *Meat Science*, 81(4), 573–579.
- Kempster, A. J., & Evans, D. G. (1979). The Effects Of Genotype, Sex And Feeding Regimen On Pig Carcass Development:2. Tissue Weight Distribution And Fat Partition Between Depots. *The Journal of Agricultural Science*, 93(2), 349–358. <https://doi.org/10.1017/S0021859600038028>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kim, G. D., Jeong, J. Y., Jung, E. Y., Yang, H. S., Lim, H. T., & Joo, S. T. (2013). The influence of fiber size distribution of type IIB on carcass traits and meat quality in pigs. *Meat Science*, 94(2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.02.001>
- Kim, J. K., Gimeno, R. E., Higashimori, T., Kim, H.-J., Choi, H., Punreddy, S., ... Shulman, G. I. (2004). Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 113(5), 756–763. <https://doi.org/10.1172/jci18917>
- Knoop, F. (1904). Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. *Beitr Chem Physiol Pathol*. Verlag nicht ermittelbar.
- Kociucka, B., Cieslak, J., & Szczerbal, I. (2012). Three-dimensional arrangement of genes involved in lipid metabolism in nuclei of porcine adipocytes and fibroblasts in relation to their transcription level. *Cytogenetic and Genome Research*, 136(4), 295–302. <https://doi.org/10.1159/000338255>
- Kouba, M., & Bonneau, M. (2009). Compared development of intermuscular and subcutaneous fat in carcass and primal cuts of growing pigs from 30 to 140 kg body weight. *Meat Science*, 81(1), 270–274.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.08.001>

- Kouba, Maryline, & Sellier, P. (2011). A review of the factors influencing the development of intermuscular adipose tissue in the growing pig. *Meat Science*, 88(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.003>
- Krämer, A., Green, J., Pollard, J., & Tugendreich, S. (2014). Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis. *Bioinformatics*, 30(4), 523–530. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt703>
- Kuivaniemi, H., & Tromp, G. (2019, July 30). Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>
- Latorre, M. A., Lázaro, R., Valencia, D. G., Medel, P., & Mateos, G. G. (2004). The effects of gender and slaughter weight on the growth performance, carcass traits, and meat quality characteristics of heavy pigs. *Journal of Animal Science*, 82(2), 526–533.
- Lattka, E., Illig, T., Koletzko, B., & Heinrich, J. (2010, February). Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283327ca8>
- Lebret, B. (2008). Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal*, 2(10), 1548–1558. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002796>
- Lee, C., Scherr, H. M., & Wallingford, J. B. (2007). Shroom family proteins regulate γ -tubulin distribution and microtubule architecture during epithelial cell shape change. *Development*, 134(7), 1431–1441. <https://doi.org/10.1242/dev.02828>
- Lee, Y. B., & Kauffman, R. G. (1974). Cellular and enzymatic changes with animal growth in porcine intramuscular adipose tissue. *Journal of Animal Science*, 38(3), 532–537. <https://doi.org/10.2527/jas1974.383532x>
- Lee, Y. B., Kauffman, R. G., & Grummer, R. H. (1973). Effect of Early Nutrition on the Development of Adipose Tissue in the Pig. II. Weight Constant Basis. *Journal of Animal Science*, 37(6), 1319–1325. <https://doi.org/10.2527/jas1973.3761319x>
- Lefaucheur, L., Le Dividich, J., Mourot, J., Monin, G., Ecolan, P., & Krauss, D. (1991). Influence of environmental temperature on growth, muscle and adipose tissue metabolism, and meat quality in swine. *Journal of Animal Science*, 69(7), 2844–2854. <https://doi.org/10.2527/1991.6972844x>
- Liu, G., Jennen, D. G. J., Tholen, E., Juengst, H., Kleinwächter, T., Hölker, M., ... Wimmers, K. (2007). A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. *Animal Genetics*, 38(3), 241–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01592.x>

- Liu, G., Kim, J. J., Jonas, E., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Murani, E., ... Schellander, K. (2008). Combined line-cross and half-sib QTL analysis in Duroc-Pietrain population. *Mammalian Genome*, *19*(6), 429–438. <https://doi.org/10.1007/s00335-008-9132-y>
- Lizardo, R., Van Milgen, J., Mourot, J., Noblet, J., & Bonneau, M. (2002). A nutritional model of fatty acid composition in the growing-finishing pig. *Livestock Production Science*, *75*(2), 167–182. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00312-8)
- Lopez-Bote, C. J. (1998). Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science*, *49*, S17–S27.
- Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-De La Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega-Gomez, A., ... Muriana, F. J. G. (2014). Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. *Biochim Biophys Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, X., Ji, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, S., An, Y., ... Zheng, Y. (2012). Resistance to obesity by repression of VEGF gene expression through induction of brown-like adipocyte differentiation. *Endocrinology*, *153*(7), 3123–3132. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1151>
- Magaña, M. M., Lin, S. S., Dooley, K. A., & Osborne, T. F. (1997). Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. *Journal of Lipid Research*, *38*(8), 1630–1638.
- Martin, A. H., Fredeen, H. T., Weiss, G. M., & Carson, R. B. (1972). Distribution and Composition of Porcine Carcass Fat. *Journal of Animal Science*, *35*(3), 534–541. <https://doi.org/10.2527/jas1972.353534x>
- Martins, J. M., Neves, J. A., Freitas, A., & Tirapicos, J. L. (2015). Rearing system and oleic acid supplementation effect on carcass and lipid characteristics of two muscles from an obese pig breed. *Animal*, *9*(10), 1721–1730. <https://doi.org/10.1017/S175173111500066X>
- Martins, J. M., Silva, D., Albuquerque, A., Neves, J., Charneca, R., & Freitas, A. (2021). Physical activity effects on blood parameters, growth, carcass, and meat and fat composition of portuguese alentejano pigs. *Animals*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ani11010156>
- Martins, José M., Neves, J. A., Freitas, A., & Tirapicos, J. L. (2012). Effect of long-term

- betaine supplementation on chemical and physical characteristics of three muscles from the Alentejano pig. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2122–2127. <https://doi.org/10.1002/JSFA.5595>
- McCaffrey, T. A., Fu, C., Du, B., Eksinar, S., Kent, K. C., Harry, B., ... Collins, T. (2000). High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 105(5), 653–662. <https://doi.org/10.1172/JCI8592>
- McEvoy, F. J., Strathe, A. B., Madsen, M. T., & Svalastoga, E. (2007). Changes in the relative thickness of individual subcutaneous adipose tissue layers in growing pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-32>
- McLaughlin, R. M., & Fish, R. E. (1994). Clinical Biochemistry and Hematology. In P. J. Manning, D. H. Ringler, & C. E. Newcomer (Eds.), *The Biology of the Laboratory Rabbit* (2nd ed., pp. 111–127). San Diego, CA, USA.: Academic Press.
- McMeekan, C. P. (1940). Growth and development in the pig, with special reference to carcass quality characters. I. *The Journal of Agricultural Science*, 30(2), 276–343. <https://doi.org/10.1017/S0021859600048024>
- Mejía, K., C. Lemus, C., Huerta, R., Almaguel, R., & Ly, J. (2012). NIVELES SÉRICOS DE TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL EN CERDOS CUINO MEXICANO K. הנוטע עלון, 19(número 1), 37–39. Retrieved from <http://dspace.uan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/895>
- Mertens, A., & Holvoet, P. (2001). Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal*, 15(12), 2073–2084. <https://doi.org/10.1096/FJ.01-0273REV>
- Michal, J. J., Zhang, Z. W., Gaskins, C. T., & Jiang, Z. (2006). The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Animal Genetics*, 37(4), 400–402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x>
- Ministerio de Agricultura, A. y M. A. Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico., 10 Boe § (2014).
- Miron, M., Woody, O. Z., Marcil, A., Murie, C., Sladek, R., & Nadon, R. (2006). A methodology for global validation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-333>
- Mitchel, A. D., Scholz, A. M., & J. Mersmann, H. (2001). Growth and body composition. In W. G. Pond & H. J. Mersmann (Eds.), *Biology of the Domestic Pig* (p. 760). Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Moeller, S. J., & Christian, L. L. (1998). Evaluation of the accuracy of real-time

- ultrasonic measurements of backfat and loin muscle area in swine using multiple statistical analysis procedures. *Journal of Animal Science*, 76(10), 2503–2514. <https://doi.org/10.2527/1998.76102503X>
- Monziols, M., Bonneau, M., Davenel, A., & Kouba, M. (2005). Tissue distribution in pig carcasses exhibiting large differences in their degree of leanness, with special emphasis on intermuscular fat. *Livestock Production Science*, 97(2–3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.05.004>
- Moody, W. G., & Zobrisky, S. E. (1966). Study of Backfat Layers of Swine. *Journal of Animal Science*, 25(3), 809–813. <https://doi.org/10.2527/jas1966.253809x>
- Morales, J., Baucells, M. D., Pérez, J. F., Mourot, J., & Gasa, J. (2003). Body fat content, composition and distribution in Landrace and Iberian finishing pigs given ad libitum maize- and acorn-sorghum-maize-based diets. *Animal Science*, 77(2), 215–224. <https://doi.org/10.1017/S1357729800058951>
- Morcuende, D., Estévez, M., Ruiz, J., & Cava, R. (2003). Oxidative and lipolytic deterioration of different muscles from free-range reared Iberian pigs under refrigerated storage. *Meat Science*, 65(3), 1157–1164. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00344-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00344-3)
- Mourot, J., Kouba, M., & Peiniau, P. (1995). Comparative study of in vitro lipogenesis in various adipose tissues in the growing domestic pig (*Sus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 111(3), 379–384. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00005-S](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00005-S)
- Muñoz, G., Alves, E., Fernández, A., Óvilo, C., Barragán, C., Estellé, J., ... Fernández, A. I. (2007). QTL detection on porcine chromosome 12 for fatty-acid composition and association analyses of the fatty acid synthase, gastric inhibitory polypeptide and acetyl-coenzyme A carboxylase alpha genes. *Animal Genetics*, 38(6), 639–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01668.x>
- Muñoz, M., Bozzi, R., García-Casco, J., Núñez, Y., Ribani, A., Franci, O., ... Óvilo, C. (2019). Genomic diversity, linkage disequilibrium and selection signatures in European local pig breeds assessed with a high density SNP chip. *Scientific Reports*, 9(1), 13546–13546. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49830-6>
- Muñoz, María, Bozzi, R., García, F., Núñez, Y., Geraci, C., Crovetto, A., ... Óvilo, C. (2018). Diversity across major and candidate genes in European local pig breeds. *PLoS ONE*, 13(11), e0207475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207475>
- Muñoz, María, García-Casco, J. M., Caraballo, C., Fernández-Barroso, M. Á., Sánchez-Esquiliche, F., Gómez, F., ... Silió, L. (2018). Identification of Candidate Genes and Regulatory Factors Underlying Intramuscular Fat Content Through Longissimus Dorsi Transcriptome Analyses in Heavy Iberian Pigs. *Frontiers in Genetics*, 9, 608. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00608/BIBTEX>

- Muriel, E., Ruiz, J., Ventanas, J., Petrón, M. J., & Antequera, T. (2004). Meat quality characteristics in different lines of Iberian pigs. *Meat Science*, *67*(2), 299–307. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2003.11.002>
- Newcom, D. W., Baas, T. J., & Lampe, J. F. (2002). Prediction of intramuscular fat percentage in live swine using real-time ultrasound. *Journal of Animal Science*, *80*(12), 3046–3052.
- Newcom, D. W., Baas, T. J., Schwab, C. R., & Stalder, K. J. (2005). Genetic and phenotypic relationships between individual subcutaneous backfat layers and percentage of longissimus intramuscular fat in Duroc swine. *Journal of Animal Science*, *83*(2), 316–323.
- Nichols, T. C., Merricks, E. P., Bellinger, D. A., Raymer, R. A., Yu, J., Lam, D., ... Clemmons, D. R. (2015). Oxidized LDL and fructosamine associated with severity of coronary artery atherosclerosis in insulin resistant pigs fed a high fat/high NaCl diet. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132302>
- Nieto, R., Lara, L., García, M. A., Vílchez, M. A., & Aguilera, J. F. (2003). Effects of dietary protein content and food intake on carcass characteristics and organ weights of growing Iberian pigs. *Animal Science*, *77*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1017/S1357729800053637>
- Okuyama, H., & Ikemoto, A. (1999). Needs to modify the fatty acids composition of meat for human health. *Proceedings of the 45th ICoMST, Yokohama, Japan*, *2*, 638–640.
- Ortiz, A., García-Torres, S., González, E., Contador, R., & Tejerina, D. (2020). Antioxidants and fatty acid deposition and instrumental colour as affected by subcutaneous backfat layers and slaughtering age of Iberian x Duroc crossed pigs under Montanera. *Livestock Science*, *242*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104274>
- Óvilo, C., Benítez, R., Fernández, A., Núñez, Y., Ayuso, M., Fernández, A. I., ... Silió, L. (2014). Longissimus dorsi transcriptome analysis of purebred and crossbred Iberian pigs differing in muscle characteristics. *BMC Genomics*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-413>
- Palma-Granados, P., Seiquer, I., Benítez, R., Óvilo, C., & Nieto, R. (2019). Effects of lysine deficiency on carcass composition and activity and gene expression of lipogenic enzymes in muscles and backfat adipose tissue of fatty and lean piglets. *Animal*, *13*(10), 2406–2418. <https://doi.org/DOI:10.1017/S1751731119000673>
- Poklucar, K., Čandek-Potokar, M., Lukač, N. B., Tomažin, U., & Škrlep, M. (2020). Lipid deposition and metabolism in local and modern pig breeds: A review. *Animals*, *10*(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ani10030424>

- Ponsuksili, S., Murani, E., Walz, C., Schwerin, M., & Wimmers, K. (2007). Pre- and postnatal hepatic gene expression profiles of two pig breeds differing in body composition: Insight into pathways of metabolic regulation. *Physiological Genomics*, 29(3), 267–279. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00178.2006>
- Quintanilla, R., Pena, R. N., Gallardo, D., Cánovas, A., Ramírez, O., Díaz, I., ... Amills, M. (2011). Porcine intramuscular fat content and composition are regulated by quantitative trait loci with muscle-specific effects. *Journal of Animal Science*, 89(10), 2963–2971. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-3974>
- Ramírez, O., Burgos-Paz, W., Casas, E., Ballester, M., Bianco, E., Olalde, I., ... Pérez-Enciso, M. (2015). Genome data from a sixteenth century pig illuminate modern breed relationships. *Heredity*, 114(2), 175–184. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.81>
- Rauw, W. M., Portolés, O., Corella, D., Soler, J., Reixach, J., Tibau, J., ... Gómez-Raya, L. (2007). Behaviour influences cholesterol plasma levels in a pig model. *Animal*, 1(6), 865–871. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000018>
- Ren, Z.-Q., Xiong, Y.-Z., Deng, C.-Y., & Jiang, S.-W. (2011). Effects of ATP Citrate Lyase and Adipose Differentiation-Related Protein Gene Polymorphisms on Adipose Deposition and Meat Quality Traits in Pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1610–1615. <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1610.1615>
- Renaville, B., Prandi, A., Fan, B., Sepulcri, A., Rothschild, M. F., & Piasentier, E. (2013). Candidate gene marker associations with fatty acid profiles in heavy pigs. *Meat Science*, 93(3), 495–500. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.019>
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., & López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, 73(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.10.018>
- Rodríguez-Estévez, V., García, A., Peña, F., & Gómez, A. G. (2009). Foraging of Iberian fattening pigs grazing natural pasture in the dehesa. *Livestock Science*, 120(1–2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2008.05.006>
- Rodríguez-Valdovinos, C., García-Casco, J., García-Ruiz, F., Núñez-Moreno, Y., & Silió-López, L. (2019). A further look of the genetic origin and singularity of the Torbiscal Iberian pig line. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(1), e0402–e0402. <https://doi.org/10.5424/SJAR/2019171-13618>
- Rold, M., & Laguna, E. (1992). Historia , Evolución Y Situación Actual Del Cerdo. In M.A.P.A. (Ed.), *El Cerdo Ibérico, la Naturaleza, la Dehesa. Simposio de Cerdo Ibérico* (pp. 4–7). Zafra.

- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, *444*(7121), 847. <https://doi.org/10.1038/NATURE05483>
- Roy, H., Bhardwaj, S., & Ylä-Herttuala, S. (2006, May 22). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters*. FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.087>
- Ruiz Carrascal, J., & Lopez-Bote, C. (2002). Improvement of dry-cured ham quality by lipid modification through dietary means. *Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products*, 255–271. <https://doi.org/81-7736-125-2>
- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., & López-Bote, C. J. (1998). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, *49*(2), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00136-8)
- Rzehak, P., Heinrich, J., Klopp, N., Schaeffer, L., Hoff, S., Wolfram, G., ... Linseisen, J. (2009). Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 fatty acid desaturase 2 (FADS1 FADS2) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. *British Journal of Nutrition*, *101*(1), 20–26. <https://doi.org/10.1017/S0007114508992564>
- Salati, L. M., & Goodridge, A. G. (1996). *Chapter 4 Fatty acid synthesis in eukaryotes. New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 31). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60511-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60511-6)
- Sather, A. P., Jones, S. D. M., Schaefer, A. L., Colyn, J., & Robertson, W. M. (1997). Feedlot performance, carcass composition and meat quality of free-range reared pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, *77*(2), 225–232. <https://doi.org/10.4141/A96-093>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *77*(2), 493–501. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.1994.77.2.493>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, *7*, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Sellier, P. (1998). Genetics of meat and carcass traits. *The Genetics of the Pig.*, 463–510.
- Serra, X., Gil, F., Pérez-Enciso, M., Oliver, M. A., Vázquez, J. M., Gispert, M., ... Noguera, J. L. (1998). A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science*, *56*(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/S0301->

6226(98)00151-1

- Simopoulos, A. P. (2004, February). Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Reviews International*. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1081/FRI-120028831>
- Sisson, S., & Grossman, J. D. (1995). *Anatomia de los animales los animales domesticos* (5th ed., Vol. 1). MASSON. Retrieved from <https://www.casadellibro.com/libro-anatomia-de-los-animales-domesticos-tomo-i-5aa-ed/9788445807224/639056>
- Sprecher, H., Luthria, D. L., Mohammed, B. S., & Baykousheva, S. P. (1995, December 1). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)41084-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)41084-3)
- Stachowiak, M., & Flisikowski, K. (2019). Analysis of allele-specific expression of seven candidate genes involved in lipid metabolism in pig skeletal muscle and fat tissues reveals allelic imbalance of ACACA, LEP, SCD, and TNF. *Journal of Applied Genetics*, *60*(1), 97–101. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00485-z>
- Stachowiak, M., Nowacka-Wozuk, J., Szydłowski, M., & Switonski, M. (2013). The ACACA and SREBF1 genes are promising markers for pig carcass and performance traits, but not for fatty acid content in the longissimus dorsi muscle and adipose tissue. *Meat Science*, *95*(1), 64–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.021>
- Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., & Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, *94*(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008>
- Stoffel, W., Holz, B., Jenke, B., Binczek, E., Günter, R. H., Kiss, C., ... Addicks, K. (2008). Δ 6-Desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of ω 3- and ω 6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO Journal*, *27*(17), 2281–2292. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.156>
- Sun, J., Pan, C. Q., Chew, T. W., Liang, F., Burmeister, M., & Low, B. C. (2015). BNIP-H Recruits the Cholinergic Machinery to Neurite Terminals to Promote Acetylcholine Signaling and Neuritogenesis. *Developmental Cell*, *34*(5), 555–568. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.08.006>
- Suryawan, A., & Hu, C. Y. (1995). The primary cell culture system for preadipocytes. *The Biology of Fat in Meat Animals*. Champaign, Illinois, American Society of Animal Science, 78–92.
- Team, Rs. (2020). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

- Tejeda, J. F., Gandemer, G., Antequera, T., Viau, M., & García, C. (2002). Lipid traits of muscles as related to genotype and fattening diet in Iberian pigs: Total intramuscular lipids and triacylglycerols. *Meat Science*, *60*(4), 357–363. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00143-7)
- Tejeda, J. F., Hernández-Matamoros, A., Paniagua, M., & González, E. (2020). Effect of free-range and low-protein concentrated diets on growth performance, carcass traits, and meat composition of iberian pig. *Animals*, *10*(2), 273. <https://doi.org/10.3390/ani10020273>
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “ montanera” feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry*, *124*(3), 997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.058>
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza De Vaca, M., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2012). Effect of production system on physical-chemical, antioxidant and fatty acids composition of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from Iberian pig. *Food Chemistry*, *133*(2), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.025>
- Tian, B., Nowak, D. E., & Brasier, A. R. (2005). A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF- κ B control. *BMC Genomics*, *6*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-137>
- Torres-Rovira, L., Pallares, P., Gonzalez-Añover, P., Perez-Solana, M. L., & Gonzalez-Bulnes, A. (2011). The effects of age and reproductive status on blood parameters of carbohydrate and lipid metabolism in Iberian obese sows. *Reproductive Biology*, *11*(2), 165–171. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60053-9](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60053-9)
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet (London, England)*, *338*(8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, *3*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Ventanas, S., Tejeda, J. F., & Estévez, M. (2008). Chemical composition and oxidative status of tissues from Iberian pigs as affected by diets: Extensive feeding v. oleic acid- and tocopherol-enriched mixed diets. *Animal*, *2*(4), 621–630. <https://doi.org/10.1017/S1751731107001528>
- Ventanas, Sonia, Ventanas, J., Jurado, Á., & Estévez, M. (2006). Quality traits in muscle biceps femoris and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian

- × Duroc crossbred pigs. *Meat Science*, 73(4), 651–659.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.009>
- Verschueren, K. H. G., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., ... Verstraete, K. (2019). Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature*, 568(7753), 571–575.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1095-5>
- Vessby, B., Gustafsson, I. B., Tengblad, S., Boberg, M., & Andersson, A. (2002). Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967, 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04275.x>
- Vidal, O., Varona, L., Oliver, M. A., Noguera, J. L., Sánchez, A., & Amills, M. (2006). Malic enzyme 1 genotype is associated with backfat thickness and meat quality traits in pigs. *Animal Genetics*, 37(1), 28–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01366.x>
- Villaplana-Velasco, A., Noguera, J. L., Pena, R. N., Ballester, M., Muñoz, L., González, E., ... Ibáñez-Escriche, N. (2021). Comparative Transcriptome Profile between Iberian Pig Varieties Provides New Insights into Their Distinct Fat Deposition and Fatty Acids Content. *Animals*, 11(3), 627.
- Wagner, J. R., Schinckel, A. P., Chen, W., Forrest, J. C., & Coe, B. L. (1999). Analysis of body composition changes of swine during growth and development. *Journal of Animal Science*, 77(6), 1442–1466. <https://doi.org/10.2527/1999.7761442x>
- Wakil, S. J. (1961). Mechanism of fatty acid synthesis. *Journal of Lipid Research*, 2(1), 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39034-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39034-9)
- Wang, Y., Ma, C., Sun, Y., Li, Y., Kang, L., & Jiang, Y. (2017). Dynamic transcriptome and DNA methylome analyses on longissimus dorsi to identify genes underlying intramuscular fat content in pigs. *BMC Genomics* 2017 18:1, 18(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1186/S12864-017-4201-9>
- Watford, M. (2003). The urea cycle: Teaching intermediary metabolism in a physiological setting. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31(5), 289–297. <https://doi.org/10.1002/BMB.2003.494031050249>
- Webb, E. C., & O'Neill, H. A. (2008). The animal fat paradox and meat quality. *Meat Science*, 80(1), 28–36.
- Weston, A. R., Rogers, R. W., & Althen, T. G. (2002). REVIEW: The Role of Collagen in Meat Tenderness. *Professional Animal Scientist*, 18(2), 107–111.
[https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31497-2](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31497-2)
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., ... Whittington, F. M. (2008a). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343–358.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., ... Whittington, F. M. (2008b). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, *78*(4), 343–358.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>

Wood, J. D., Nute, G. R., Richardson, R. I., Whittington, F. M., Southwood, O., Plastow, G., ... Chang, K. C. (2004). Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science*, *67*(4), 651–667.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.007>

Wünsche, J., Meinel, D.-B. M., Hennig, U., Kreienbring, F., & Hd, B. (1982). Einfluß einer abgestuften Proteinversorgung bei hohem Energieniveau auf die Mastleistung sowie den Ansatz und die Verwertung von Futterenergie, Protein und Aminosäuren durch weibliche Mastschweine. *Archives of Animal Nutrition*, *32*, 465–476.

Zhao, S. M., Ren, L. J., Chen, L., Zhang, X., Cheng, M. L., Li, W. Z., ... Gao, S. Z. (2009). Differential expression of lipid metabolism related genes in porcine muscle tissue leading to different intramuscular fat deposition. *Lipids*, *44*(11), 1029–1037. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3356-9>

Zuo, B., Yang, H., Wang, J., Lei, M. G., & Xiong, Y. Z. (2007). Molecular characterization, sequence variation and association with fat deposition traits of ACOX1 gene in pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, *16*(3), 433–444. <https://doi.org/10.22358/jafs/66799/2007>