



Universitat Autònoma
de Barcelona

*Efecto del perfil en ácidos grasos de la
ración sobre la cantidad y distribución de
lípidos en el pollo de carne*

Realizada por Gabriele Ferrini

Dirigida por la Dra. Ana Barroeta Lajusticia y el Dr. Edgar García
Manzanilla



Universitat Autònoma
de Barcelona

La Dra. Ana Barroeta Lajusticia, Catedrática de Universidad, y el Dr. Edgar García Manzanilla del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, como codirectores de la presente Tesis Doctoral

CERTIFICAN QUE:

la memoria titulada “**Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la cantidad y distribución de lípidos en pollos de carne**” presentada por Gabriele Ferrini para optar al grado Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola acabada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Bellaterra a 21 de Septiembre de 2009.

Dra. Ana Barroeta Lajusticia

Dr. Edgar García Manzanilla

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente memoria de Tesis ha sido posible gracias a la colaboración que el grupo de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, y en concreto la Dra. Ana Barroeta Lajusticia, ha mantenido con el Departament de Nutrició Animal del Institut de Recerca en Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Mas de Bover, con el Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y el grupo de Nutrición Animal de la Estación Experimental de Zaidin del Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC) de Granada.

La presente Tesis ha sido realizada gracias a una beca de formación de personal de investigación (FP) de la Generalitat de Catalunya, y al proyecto de investigación del Instituto Nacional de Investigación Agroalimentaria (INIA RTA03-060-C2-2).

A mis profesores

A mi familia

A mis amigos

RESUMEN

Está bien establecido que a través de la modificación de la fracción grasa de la ración de pollos de carne, podemos alterar la composición lipídica de los diferentes tejidos. Además, conforme aumenta el grado de insaturación de la ración, a igual nivel de inclusión de grasa, se produce una disminución de la cantidad de grasa depositada. Estos resultados son sorprendentes sobre todo si se tiene en cuenta los valores de energía metabolizable aparente (EMA) de las grasas. Es bien conocido que los aceites vegetales tienen mayor EMA que las grasas de origen animal, por tanto parece lógico pensar que a medida que sustituimos la grasa saturada por insaturada (aunque mantengamos la misma energía bruta), el engrasamiento corporal de las aves se incrementa. Sin embargo, es todo lo contrario: la inclusión de fuentes grasas con un mayor grado de poliinsaturación, reduce el contenido lipídico de las aves, mientras que los mayores niveles de engrasamiento se observan en pollos que consumieron una fuente de grasa animal.

El objetivo del proyecto fue avanzar en la investigación del efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la cantidad y distribución de lípidos en los diferentes tejidos del animal, y estudiar las razones metabólicas por las cuales se producen estas diferencias de depósito cuando alimentamos a las aves con raciones ricas en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) comparados con raciones ricas en ácidos grasos saturados (AGS). Para ello se realizaron 5 trabajos experimentales.

En el primer trabajo experimental se estudió el efecto del perfil en ácidos grasos (AG) de la ración sobre los principales depósitos de grasa: piel (SK; incluyendo la grasa subcutánea) y grasa abdominal (GA). 144 pollos hembras fueron alimentados con una dieta baja en grasa (B; 0,5% de grasa añadida), o con raciones suplementadas con el 10% de: sebo (T), aceite de girasol rico en ácido oleico (SOO), aceite de girasol rico en ácido linoleico (SOL), aceite de linaza rico en ácido linolénico (LO) o una mezcla de grasas (M: 55% de T + 35% de LO + 10% SOL) que contenía la misma proporción en AGS, AG monoinsaturados, y AGPI. Se evaluó la digestibilidad del total de AG (AGT) y la energía metabolizable aparente (EMA) de los piensos experimentales. El día 42, las aves fueron sacrificadas determinándose el peso de la GA y la SK así como su perfil en AG. En cuanto a las raciones que contenían el 10% de grasa añadida, la más saturada (T) dio lugar a los valores más bajos de digestibilidad de AGT y de porcentaje de EMA.

Los animales alimentados con la ración más poliinsaturada, comparado con los alimentados con un pienso más saturado, registraron un menor depósito de SK tanto en valores absolutos (LO: 145 vs T: 159 y M: 168 g, $P < 0,001$) como relativos (LO: 6,94 vs T: 7,39 y M: 7,52 g / 100 g de peso vivo; $P < 0,001$). Además, el menor depósito de GA se observó en el tratamiento LO (LO: 26,3 g vs T: 37,6 y M: 39,9 g, $P < 0,001$). Los tratamientos con alto contenido en grasa dieron lugar a importantes modificaciones en el perfil en ácidos grasos de los tejidos estudiados, reflejando perfiles en AG similares a los piensos consumidos. Así, el consumo de piensos ricos en AGPI, en comparación con el consumo de piensos ricos en AGS, da lugar a una reducción de la cantidad de GA y SK de aproximadamente el 30% y el 9%, respectivamente.

En el segundo trabajo experimental se evaluó el efecto de la fuente y nivel de grasa de la ración sobre la retención de energía (ER) y grasa en el animal entero. 48 pollos hembras fueron distribuidos en 6 tratamientos que diferían en el nivel: 3, 6 y 9 % y tipo de grasa añadida: sebo (S) y linaza (L). Se realizó un balance *in vivo* con recogida total de la excreta y sacrificio inicial y final. Los resultados demuestran que conforme aumentamos el nivel de inclusión de grasa aumenta la cantidad ER depositada en el animal entero. Por el contrario, la retención de nitrógeno disminuye conforme aumenta el nivel de inclusión, independientemente del tipo de grasa añadida a la ración. Los animales que consumieron la dieta L, presentaron la menor ER (S: 1009 vs. L: 906 kJ/100 g de ganancia de peso vivo; $P = 0,006$), en paralelo, con el menor depósito de grasa corporal (S: 11.2 g vs. L: 8.99 g/100 g de ganancia de peso vivo; $P = 0,01$). En este sentido, la retención de grasa en el animal es menor si la grasa que incorporamos a la ración es poliinsaturada en comparación con grasa saturada (S: 1.05 vs. L: 0.73 g grasa retenida/g grasa absorbida), independientemente de su nivel de inclusión. Estos resultados indican que los pollos que consumieron las dietas altamente poliinsaturadas depositaron menos energía y esta disminución fue a causa de una menor retención de grasa, en concreto de los ácidos grasos poliinsaturados.

El objetivo del tercer trabajo fue evaluar el efecto del nivel de insaturación de los AG de la ración sobre algunos parámetros del metabolismo lipídico de pollos de carne. Para ello se determinaron las hormonas tiroideas (T3, T4) en suero, y la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa (LPL), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima málico (ME), y L-3-hydroxyacyl CoA deshidrogenasa (L3HOAD) en tejido

adiposo, hígado y corazón. Los piensos utilizados fueron constituidos por un pienso bajo en grasa (BS: 0,5 % de aceite de girasol) y dos piensos con el 10% de linaza (LO), rico en AGPI n-3, y el 10 % de sebo (TA), rico en AGS. El perfil en AG de los tejidos estudiados fue el reflejo del perfil AG de la ración. El pienso BS causó una menor actividad de LPL y, por consiguiente, una menor deposición de triglicéridos en la grasa abdominal en comparación con los piensos LO y TA. Los pollos alimentados con LO registraron un menor depósito de grasa abdominal, una mayor actividad de la L3HOAD (β -oxidación), y un aumento de la hormona T3 circulante comparados con las aves alimentadas con un pienso rico en AGS. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en síntesis *de novo* de lípidos. Los resultados del experimento sugieren que la β -oxidación de AG, en lugar de la síntesis, puede ser la causa de las modificaciones en la deposición de grasa debida al consumo de ácidos grasos poliinsaturados n-3. El aumento de los niveles de T3 sugieren que esta hormona podría estar relacionada con la menor deposición de grasa causada por LO.

Se realizaron el cuarto y quinto experimento con el fin de determinar si los AGPI n-3 modifican la eficiencia de utilización de la energía metabolizable aparente (EMA) destinada a crecimiento (*kg*) en comparación con los AGS. En el Experimento 4 se utilizó el método de sacrificios comparados. A 1446 ± 6.4 g de peso y durante 21 días, 4 grupos de 8 pollos fueron alimentados *ad libitum* o restringido con 2 piensos que contenían el 9 % de sebo (AGPI/AGS, 0,32; dieta T, 10,5 % de grasa bruta) y el 9 % de aceite de linaza (AGPI/AGS, 5,19; dieta LO; 10,4 % de grasa bruta). La ER en el animal fue menor en LO ($P \leq 0.05$) en comparación con T (345 frente a 457 kJ/ave/día, $P = 0.007$), y en paralelo a la menor cantidad de ER en forma de grasa (255 vs 369 kJ/100 g de incremento de peso vivo; $P = 0.067$). Estas diferencias no fueron debidas al nivel de alimentación. La *kg*, calculado como la pendiente de la regresión lineal entre la energía metabolizable aparente ingerida (EMAI) y la ER, no fue diferente entre piensos, aunque la ordenada en origen fue mayor para los animales alimentados con sebo, lo que indica una mayor deposición de grasa independientemente de la cantidad de EMAI. En el experimento 5, se realizaron mediciones de intercambio gaseoso. Tres grupos de 8 aves fueron alimentadas *ad libitum* o restringido con un pienso control (C: 2,6 % de la grasa bruta), con un pienso con el 9 % de sebo (dieta T, 11,1 % de grasa bruta) o el 9 % de aceite de linaza (dieta LO, 11,0 % de grasa bruta). Entre los días 39 y 52 de edad la producción de calor (PC) de cada grupo de aves se midió dos veces por cada nivel de

alimentación mediante cámaras respirométricas durante 24 horas. Los pollos alimentados con LO presentaron menor grasa abdominal en comparación con los que consumieron T (32 vs 25 g; $P=0,005$). Sin embargo, la PC no fue diferente entre dietas. Los resultados de estos experimentos indican que los AGPI *n*-3 reducen la ER en comparación con los AGS, se alimente los animales *ad libitum* o restringido. Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las *kg* de las grasas. Por lo tanto, una mayor necesidad en energía de mantenimiento es infravalorada cuando se alimentan las aves con raciones ricas en AGPI *n*-3 comparados con las alimentadas con AGS. El tipo de grasa no afectó a la PC.

El efecto de los AGPI *n*-3 sobre la deposición de grasa podría tener aplicaciones prácticas en la formación de los depósitos lipídico del pollo de carne y, es de interés en futuros estudios en mamíferos.

ABSTRACT

It is well established that the modification of dietary fatty acid can changes the lipid composition in different tissues in broiler chickens. Moreover, for an equal level of dietary added fat, an increase in the degree of unsaturation decreases the amount of deposited fat. This result is surprisingly associated to a higher apparent metabolizable energy (EMA) of unsaturated fats. It is well known that vegetable oils have higher EMA contents than animal fats, therefore it seems logical to think that replace saturated with unsaturated fat at the same dietary gross energy, the body fat depots of birds increases. However, the consumption of polyunsaturated fat sources reduces lipid content of birds, while the highest levels of fat depots is observed in chickens that consume a source of animal fat.

This project aimed to better understand the effect of dietary fatty acid profile on the amount and distribution of lipids in different tissues of the animal and study the metabolic effects why those differences in fat depots occur when poultry is fed with diets rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) compared to diets rich in saturated fatty acids (SFA). Thus, five experiments were performed.

The aim of the first study was to determine the effect of different dietary fatty acid profiles on the main fat depots of broiler chickens: skin including subcutaneous fat (SK) and abdominal fat pad (AF). One-hundred forty-four female broiler chickens were fed a low fat diet (B; 0.5 % of added fat) or diets supplemented with 10 % of tallow (T), sunflower oil rich in oleic acid (SOO), sunflower oil rich in linoleic acid (SOL), linseed oil rich in linolenic acid (LO) or a mix of fats (M: 55 % of T + 35 % of LO + 10 % of SOL) that contained one-third each of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids. The animals were housed in 36 cages and were randomly distributed into 6 dietary treatments with 6 replicates each. Experimental diets were evaluated for apparent total fatty acid availability and apparent metabolizable energy (AME). On d 42, birds were slaughtered in order to determine the weight of AF and SK and fatty acid profile. Regarding the diets containing 10% added fat, the highest saturated diet (T) resulted in the lowest values of apparent total fatty acid availability and percentage of AME. Animals fed the most polyunsaturated diet (LO) had a lower SK deposition than those fed saturated diet, on both an absolute (LO: 145 vs. T: 159 and M: 168 g; $P < 0.001$) and a relative basis (LO: 6.94 vs. T: 7.39 and M: 7.52 g/ 100 grams

of body weight; $P < 0.001$). Furthermore, the lowest AF depot was observed in LO diet (LO: 26.3 g vs. T: 37.6 and M: 39.9 g; $P < 0.001$). The added fat treatments caused significant but similar changes in fatty acid profile of both studied tissues. In conclusion, feeding broiler chickens polyunsaturated fatty acids, in comparison to dietary saturated fatty acids, reduced the amount of both AF and SK by approximately 30 % and 9 %, respectively.

The second experiment was conducted in broiler chickens to determine whether dietary fat source and dietary fat level modify the energy and body fat retention. Forty eight 1-d-old female broiler chickens were fed 6 diets differing in level of added fat (3, 6 and 9 % of added fat), and type (tallow (S) and linseed (L)). Between 1445 ± 11 and 2.596 ± 218 g of body weight, a comparative slaughter method was followed. The results show that when the level of dietary fat increases the whole animal retained energy (RE) increases. On another hand, retained nitrogen decreases when the level of inclusion increases independently of the source of dietary added fat. Between fats, birds fed L had lower RE (S: 1009 vs. L: 906 kJ/100 g of gain weight, $P = 0.006$) and lower body fat (S: 11.2 g vs. L: 8.99 g/100 g of body weight gain, $P = 0.01$) than those fed S. In addition, the retention efficiency of body fat was lower when the polyunsaturated fat was added compared to the saturated added fat (S: 1.05 vs. L: 0.73 g retained fat / g of absorbed fat) regardless of the level of inclusion. These results suggest that chickens fed diets with higher level of polyunsaturation retain lower energy and this decline is due to the lower retained fat, specifically due to the polyunsaturated fatty acids.

The aim of third experiment was study the effect of n-3 fatty acids (FA) on lipid metabolism. Serum thyroid hormones (T3, T4) and lipoprotein-lipase (LPL), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), malic enzyme (ME), and L-3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (L3HOAD) activities were studied in chickens fed three diets: a basal diet low in fat and energy (BS) and two diets rich in n-3 poly-unsaturated FA (10% linseed oil; LO) or in saturated FA (10 % tallow; TA). Dietary FA profiles resulted in different profiles of FA in the tissues. The BS diet caused lower LPL activity and fat deposition compared to the other diets. Chickens fed the LO diet showed lower abdominal fat and higher L3HOAD activities (β -oxidation) and serum T3 levels than those fed the TA diet. There were no differences in lipid synthesis. Lipid β -oxidation may be more relevant than synthesis of FA in the lower fat deposition caused by n-3 FA

compared to saturated FA in chicken diets. Higher serum T3 suggests a role of this hormone in the lower fat deposition caused by LO.

The last two experiments were carried out in broiler chickens to determine whether n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) modify efficiency of utilization of apparent metabolizable energy (AME) for growth compared to saturated fatty acids (SFA). In experiment 4, the comparative slaughter method was followed. At 1446 \pm 6.4 g of weight and during 21-d, 4 groups of 8 birds were fed *ad libitum* or restricted two diets containing either 9 % of tallow (PUFA/SFA, 0.32; diet T, 10.5 % of ether extract (EE)) or 9 % of linseed oil (PUFA/SFA, 5.19; diet LO, 10.4 % of EE). Total retained energy (RE) was lower ($P \leq 0.05$) in LO compared to T (345 vs. 457 kJ/bird/d; $P = 0.007$), in parallel with a lower RE as fat (255 vs. 369 kJ/100g weight gain; $P = 0.067$). This difference was not affected by the dietary restriction. As a consequence, the efficiency of utilization of AME for growth (kg), calculated as the slope of the linear regression of RE on apparent metabolizable energy intake (AMEI), was not different between diets but intercept was higher for animals fed tallow, indicating a constant higher fat deposition independently of the AMEI. In Experiment 5, gaseous exchange measurements were performed. Three groups of 8 birds were fed *ad libitum* or restrictedly a control diet (C: 2.6 % of EE) or one of two diets containing 9 % of tallow (diet T, 11.1 % of EE) or 9 % of linseed oil (diet LO, 11.0 % of EE). Between days 39 and 52 of age heat production (HP) of each group was measured twice at each of the two levels of feeding in respirometric chambers for 24 hours. Chickens fed LO had lower abdominal fat pad than those T diet (32 vs. 25 g; $P = 0.005$). However, HP was not different between these two diets. The results of these experiments indicate that n-3 fatty acids reduce energy retention compared to saturated fatty acids when the animals are fed both, *ad libitum* or restricted, and there is no difference in the efficiency of utilization of the AMEI between the fats. Thus, a higher maintenance energy requirement is inferred for chickens fed n-3 FA vs. SFA.

These effects of n-3 FA in fat deposition could have applications in management of fat in chicken carcasses and points interesting conclusions to be studied in mammals in the future.

ÍNDICE
1. INTRODUCCIÓN

1.1. Digestión y absorción de grasas.....	3
1.2. Transporte lipídico y entrada de ácidos grasos en los tejidos.....	6
1.2. 1 Importancia de la Lipoproteína Lipasa en los diferentes tejidos.....	8
1.3. Síntesis de ácidos grasos.....	10
1.4. Oxidación de ácidos grasos.....	15
1.5. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo lipídico.....	21
1.6. Las grasas como fuente de energía	24
1.6.1. Métodos para determinar la producción de calor y la retención de energía.....	27

2. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS..... 35**3. TRABAJO 1****Dietary polyunsaturated fat reduces skin fat as well as abdominal fat in broiler chickens**

3.1. Abstract.....	41
3.2. Resumen.....	43
3.3. Introduction.....	45
3.4. Material and methods.....	45
3.4.1. Experiment design.....	45
3.4.2. Analytical determinations.....	47
3.4.3. Fatty acid analysis.....	47
3.4.4. Statistical analysis.....	49
3.5. Results and discussion.....	49
3.5.1. Bird performance.....	49
3.5.2. Skin and abdominal fat depots.....	51
3.5.3. Fatty acid composition.....	52

3.6. Conclusion..... 53

4. TRABAJO 2

Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre la retención de grasa en pollos de carne

4.1. Resumen.....59

4.2. Abstract.....61

4.3. Introducción.....63

4.4. Material y métodos.....64

 4.4.1 Animales e instalaciones.....64

 4.4.2 Piensos y diseño experimental.....64

 4.4.3. Controles de producción y recogida de muestras.....64

 4.4.4. Determinaciones analíticas.....65

 4.4.5. Cálculos.....66

 4.4.6. Análisis estadístico.....67

4.5. Resultados y discusión.....67

4.6. Conclusiones.....73

5. TRABAJO 3

Dietary n-3 fatty acids are associated with lower fat deposition, higher lipid β -oxidation and higher T3 thyroid hormone levels when compared to dietary saturated fatty acids in chickens

5.1. Abstract.....77

5.2. Resumen.....79

5.3. Introduction.....81

5.4. Materials and methods.....82

 5.4.1. Animals and diets.....82

 5.4.2. Controls and sampling.....82

 5.4.3. Chemical analysis and enzyme activities.....83

 5.4.4. Statistical analysis.....84

5.5. Results.....	84
5.6. Discussion.....	86
6. TRABAJO 4 y 5	
n-3 polyunsaturated fatty acids do not affect efficiency of energy utilization for growth (<i>kg</i>) but increases maintenance energy requirement in broiler chickens	
6.1 Abstract.....	91
6.2. Resumen.....	93
6.3. Introduction.....	95
6.4. Material and methods.....	96
6.4.1. Animals, diets and experimental design.....	96
6.4.2. Analytical determination.....	98
6.4.3. Calculations.....	99
6.4.4. Statistical analysis.....	100
6.5. Results.....	100
6.6. Discussion.....	104
7. DISCUSIÓN GENERAL	
7.1. Trabajo 1 y 2.....	109
7.2. Trabajo 3, 4 y 5.....	115
8. CONCLUSIONES.....	123
9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

INDICE DE FIGURAS* Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Digestión y la absorción de los lípidos.....	7
Figura 1.2. Transporte de lípidos.....	8
Figura 1.3. Síntesis de ácidos grasos: Lanzadera para la transferencia de grupos acetilo desde la mitocondria hasta el citosol	12
Figura 1.4. Estructura de la ácido graso sintetasa (FAS).....	13
Figura 1.5. Secuencia de cuatro pasos utilizada para alargar en dos carbonos una cadena acil graso en crecimiento.....	14
Figura 1.6. Entrada de los ácidos grasos en la mitocondria a través del transportador acil-carnitina/carnitina Fases de oxidación de ácidos grasos.....	16
Figura 1.7. Fases de oxidación de ácidos grasos.....	17
Figura 1.8. Ruta de la β -oxidación.....	18
Figura 1.9. Comparación de la β -oxidación en mitocondrias y en peroxisomas.....	19
Figura 1.10. Movilización de ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo.....	20
Figura 1.11. Síntesis y liberación de hormonas tiroideas.....	22
Figura 1.12. Mecanismo de acción de la hormona tiroidea.....	24
Tabla 1.1. Valores de energía metabolizable (EMA) para pollos de carne y proporción de AGPI de diferentes fuentes de grasas.....	27
Figura 1.13. Producción de calor en función de la energía metabolizable aparente ingerida: Partición de la energía	29

TRABAJO 1

Table 3.1. Ingredients and nutrient composition of experimental diets.....	46
---	----

* Las figuras utilizadas en la parte introductiva de la presente Memoria de Tesis (Capítulo 1) se han obtenido del libro Stryer y Lenhinger.

Table 3.2. Fatty acid composition (%) of experimental diets.....	48
Table 3.3. Effect of dietary fat type on broiler performance from 8 to 42 d of age.....	50
Table 3.4. Effect of dietary fat type on broiler energy and fatty acid (FA) digestibility balance from 29 to 31 d of age.....	50
Table 3.5. Final body weights and carcass, abdominal fat, and skin contents of broiler chickens fed various dietary fat types.....	52
Table 3.6. Effect of dietary fatty acid on the fatty acid content of skin fat including subcutaneous fat.....	54
Table 3.7. Effect of dietary fatty acid on the fatty acid content of abdominal fat pad.....	55
TRABAJO 2	
Tabla 4.1. Ingredientes y composición nutritiva analizada de los piensos experimentales.....	65
Tabla 4.2. Perfil en ácidos grasos de los piensos experimentales.....	67
Tabla 4.3. Resultados productivos de pollos de carne alimentados con distintos niveles y tipos de grasa en el pienso durante los 21 días del periodo experimental.....	69
Tabla 4.4. Efecto de diferentes tratamientos sobre el balance energético de pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental.....	69
Tabla 4.5. Efecto de diferentes niveles y tipos de grasas sobre el balance de grasa en pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental.....	70
Tabla 4.6. Efecto de diferentes niveles y tipos de grasas sobre el balance de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados durante los 21 días de periodo experimental.....	72
Tabla 4.7. Efecto de diferentes niveles y tipos de grasas sobre el balance de nitrógeno en pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental.....	73
TRABAJO 3	
Table 5.1. Ingredients and nutrient composition of experimental diet.....	83

Table 5.2. Effect of dietary fatty acid on the total fat and the fatty acid content of abdominal fat pad, liver, and heart (n = 6).....85

Table 5.3. Serum concentration of thyroid hormones, lipoprotein lipase activity (mU/ 100 g BW) in different tissues, and activity (mUI/mg protein) of liver glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), malic enzyme, and heart L-3- hydroxyacyl-Coa dehydrogenase (L3HOAD) (n = 6)86

TRABAJO 4 y 5

Figure 6.1. Experimental design: gas-exchange measurements.....98

Table 6.1. Ingredient, nutrient and major fatty acid composition of the broiler chickens diets used in Experiment 1.....101

Table 6.2. Ingredient, nutrient and major fatty acid composition of the broiler chickens diets used in Experiment 2.....101

Table 6.3. Experiment 1. Effect of the amount and type of dietary fat and feeding level on the performance of broiler chickens.....102

Table 6.4. Experiment 1. Effect of the amount and type of dietary fat and feeding level on the energy balance of broiler chickens.....102

Table 6.5. Experiment 2. Effect of the amount and type of dietary fat on the respiratory quotient (RQ) in broiler chickens.....103

Table 6.6. Experiment 2. Effect of the amount and type of dietary fat on the intake of metabolizable energy (MEI, kJ/kg^{0.75}/d) and heat production (HP, kJ/kg^{0.75}/d) of broiler chickens.....104

Table 6.7. Experiment 2. Effect the amount and type of dietary fatty acid on final body weight and abdominal fat weight of broiler chickens.....104

DISCUSIÓN GENERAL

Figura 7.1. Efecto del grado de insaturación de la ración sobre la cantidad de grasa abdominal y piel en pollos de carne (expresado en g por ave). Trabajo 1.....110

Figura 7.2. Cantidad de piel en el pollo en función de la grasa abdominal depositada, expresado en g... Trabajo 1.....	110
Figura 7.3. Energía metabolizable aparente determinada de los piensos. Trabajo 1.....	111
Figura 7.4. Energía metabolizable aparente determinada de los piensos. Trabajo 2.....	112
Figura 7.5. Energía metabolizable aparente consumida (barras lisas) y energía retenida (barra ralladas) según nivel y tipo de grasa añadida (MJ/ 100 g de ganancia de peso vivo). Trabajo 2.....	112
Figura 7.6. Efecto del tipo y del nivel de incorporación de grasa en la ración sobre el consumo de grasa digestible (barras lisas) y grasa retenida (barras ralladas) expresado en g de grasa/100 g de ganancia de peso vivo). Trabajo 2.....	113
Figura 7.7. Grasa retenida en función de la grasa digestible ingerida (g/ave). Trabajo 2.....	114
Figura 7.8. Ganancias o pérdidas (g/ ave) en ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Trabajo 2.....	115
Figura 7.9. Energía retenida (ER) en función de energía metabolizable aparente consumida (EMAI) expresados en kJ/PM/día. Trabajo 4 y 5.....	118
Tabla 7.1. Ventajas e inconvenientes de las dos tipos de técnicas de alimentación empleada para valorar raciones con diferente tipo de grasa añadida en pollos de carne.....	119

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En la formulación de piensos para pollos de carne, es habitual la inclusión de elevados niveles de grasa. Si bien una de las principales funciones de las grasas es el aporte de energía, no podemos olvidar que la composición lipídica de la ración tiene un efecto importante sobre la composición del propio animal y la carne que produce.

Así, está bien establecido que los diferentes tipos de grasas de la ración modifican no solamente el perfil en ácidos grasos (AG) de los tejidos sino también la cantidad de grasa depositada. En concreto, la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en comparación con los ácidos grasos saturados (AGS), reduce la cantidad de grasa depositada en el animal (Sanz et al., 1999, 2000; Crespo y Esteve Garcia 2001, 2002).

En la siguiente revisión bibliográfica se abordan aquellos aspectos de la nutrición y el metabolismo de las grasas que nos ayudan a comprender porque los AG, dependiendo de su configuración, se incorporan preferentemente a una determinada ruta metabólica. Se dedica especial atención a los enzimas y moléculas, considerados claves en el metabolismo de los AG. Tomando como punto de partida los AG ingeridos, se describe la digestión y absorción en el tracto digestivo. A continuación se describen las vías de transporte y distribución en el organismo y se señalan los mecanismos de oxidación y síntesis de AG.

1.1. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE GRASAS

En este apartado se describen los procesos más relevantes de la digestión y absorción lipídica en las aves. Una información más detallada puede encontrarse en las revisiones de Freeman (1984), Kroghdal (1985), Noy y Sklan (1995) y Mu y Høy (2004). El proceso de digestión de los lípidos presentes en la ración incluye los cambios físicos y químicos que sufren desde la ingestión por parte de las aves hasta su absorción a nivel intestinal. Debido a la hidrofobicidad de estos compuestos, y a que el tracto digestivo es un medio acuoso, una vez ingeridos los lípidos necesitan ser emulsionados para facilitar su transporte y su posterior digestión enzimática. En las aves, la emulsión de los glóbulos de grasa constituidos fundamentalmente por triglicéridos (TG) se inicia en la molleja (estomago muscular) y aumenta hasta llegar al intestino delgado. Durante este recorrido las gotas lipídicas se reducen de tamaño por la fuerza mecánica de los

movimientos peristálticos y, posteriormente, se mezclan con las sales biliares y las secreciones pancreáticas. Esta emulsión o digestión mecánica es importante ya que incrementa la relación superficie-volumen y se facilita el contacto de los lípidos con la lipasa pancreática, enzima encargada de la hidrólisis de los TG. En la parte proximal del intestino delgado tiene lugar la digestión enzimática propiamente dicha. La acción de la lipasa pancreática, producida en el páncreas y liberada al duodeno, se produce en la superficie de la emulsión. Esta enzima, es activada por la colipasa, cofactor que permite la unión de la lipasa pancreática con los lípidos emulsionados (Borgström, 1975). Esta actividad enzimática produce la hidrólisis de los enlaces éster en las posiciones 1 y 3 de los TG, produciendo dos AG libres y un 2-monoglicerido (Laws, 1963). Como resultado de la acción combinada con otros enzimas pancreáticos también encontramos esteroides (colesterol entre otros), lisofosfolípidos, 1,2-diglicéridos y glicerol como productos minoritarios.

Los productos de la lipólisis pueden ser clasificados de más polares (fosfolípidos, 2-monogliceridos, AG insaturados y de cadena media) a más hidrofóbicos (AG saturados de cadena larga, colesterol, éster de colesterol y vitaminas liposolubles). Estos productos resultantes de la hidrólisis serán incorporados en las micelas simples de sales biliares que son solubles en agua. Las micelas se caracterizan porque la parte hidrofóbica de las sales biliares está dirigida hacia el interior y la parte hidrofílica de cara al exterior. Así pues, el interior hidrofóbico de las micelas podrá solubilizar sustancias insolubles en agua formando las denominadas micelas mixtas (solubilización micelar). Los primeros compuestos que se incorporan en las micelas de sales biliares son: 2-monogliceridos, AG insaturados, y fosfolípidos, que tienen una cierta polaridad (Shiau, 1981). Esta entrada expande la micela mixta y permite la incorporación en el núcleo hidrofóbico de otros productos de la lipólisis más insolubles en agua como AGS de cadena larga, diglicéridos, vitaminas liposolubles y ésteres de colesterol (Krogdhal, 1985).

Los productos de la lipólisis son transportados por las micelas mixtas hasta la membrana apical de los enterocitos, donde son liberados para su absorción (Lindström, 1988). La mayor parte de las sales biliares vuelven al hígado donde son reutilizadas (circulación entero-hepática). Por otro lado, hay productos hidrosolubles de la lipólisis como el glicerol, los lisofosfolípidos y los AG de cadena media y corta que atraviesan

los enterocitos y pasan directamente a la circulación, sin la necesidad de ser incorporados dentro de las micelas (Krogdhal, 1985). Los TG y diglicéridos no digeridos, debido a su baja o nula solubilidad en las soluciones biliares, quedan acumulados en gotas de grasa insoluble en el medio acuoso intestinal (Freeman, 1984).

La absorción de los productos de la lipólisis se produce, fundamentalmente, en el yeyuno (Hurwitz et al., 1973), donde cruzan la membrana del enterocito por un mecanismo de difusión pasiva (Meddings y Dietschy, 1989). La tasa de absorción varía, principalmente, en función de la longitud y el grado de insaturación de la cadena del AG. Según Freeman (1984), y tal y como se ha descrito anteriormente, el proceso de absorción de los lípidos *in vivo* se ve limitado por la entrada de los lípidos en la fase micelar, paso que resulta imprescindible para que la absorción intestinal sea efectiva. En este sentido, Sallee (1978) indica que la solubilización micelar de un AG es inversamente proporcional a la longitud de su cadena. En cuanto al grado de insaturación, a igual longitud de cadena, la presencia de dobles enlaces aumenta la polaridad de la molécula y facilita su solubilización micelar (Infield y Annison, 1973).

El transporte de los AG a través del citosol hasta el retículo endoplasmático de los enterocitos se ve facilitado por una proteína transportadora de AG (fatty acid binding protein, FABP; Stremmel et al., 1985). El transporte hacia este orgánulo celular también parece depender de la configuración de los AG, en concreto, se ha descrito que la FABP tiene mayor afinidad por AG insaturados y menor afinidad por los AG saturados de cadena larga (Ockner y Manning, 1974). Una vez en el retículo endoplasmático, los AG son, principalmente, reesterificados a TG, si bien una parte de los AG absorbidos puede ser oxidada en la mitocondria para cubrir las necesidades energéticas del propio enterocito (Sklan et al. 1996). La reesterificación de los AG a TG se produce a partir de la unión con el glicerol, que puede tener dos orígenes: los 2-monoglicéridos procedentes de la ración o bien a través de la síntesis endógena por la vía del glicerol-3-fosfato que está presente en la célula. En el caso de las aves, los nuevos TG sintetizados son incorporados en portomicrones (PM) a través de la combinación con apolipoproteínas específicas, lo que permite su circulación hacia el resto de tejidos. Los PM observados microscópicamente tienen el mismo tamaño que los quilomicrones de los mamíferos, aunque su transporte es diferente (Fraser et al. 1986). Los PM entran directamente en la circulación sanguínea a través de la vena porta mientras que los quilomicrones son

transportados en el sistema linfático hasta la vena cava.

En el siguiente apartado se describen los sistemas de transporte de lípidos a través la circulación sanguínea y las principales vías de distribución de los AG en el organismo. Se dedica especial atención al hígado y el tejido adiposo, ya que son los principales órganos de regulación del metabolismo lipídico en las aves.

1.2. TRANSPORTE LIPÍDICO Y ENTRADA DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS TEJIDOS

El transporte de lípidos a través de un medio acuoso como la sangre, depende de su integración en estructuras anfipáticas. Las apoproteínas (“apo” designa la proteína en su forma libre de lípidos) se combinan con los lípidos para formar partículas lipoproteicas de diferente densidad que formaran los PM. Los lípidos más apolares se integran en las lipoproteínas mediante este mecanismo y son transportados hasta los tejidos, principalmente adiposo y muscular, donde serán almacenados o utilizados. Allí son hidrolizados gracias a la acción del enzima lipoproteína lipasa (LPL), localizada en el endotelio de los capilares sanguíneos (Figura 1.1). Una vez en el citosol de la célula del órgano final los AG serán utilizados como sustrato energético o serán reesterificados en forma de TG, constituyendo una reserva energética para el animal. Los PM tras ser captados por la LPL de los tejidos extrahepáticos son transformados en su forma residual (PMr), debido a la pérdida parcial de TG. Finalmente, después de esta primera liberación, los AG transportados en los PMr entraran al hígado (Nelson, 1992; Nelson y Cox, 2000; Stryer et al., 2002).

Los AG libres, más polares, pueden entrar en la sangre y circular unidos a proteínas plasmáticas (albúmina). Una importante proporción (más del 50%) de los AG de la dieta puede liberarse a la vena porta como AG no esterificados (NEFA) y por lo tanto transportados directamente al hígado por el torrente sanguíneo unidos a la albúmina (Sklan et al., 1984).

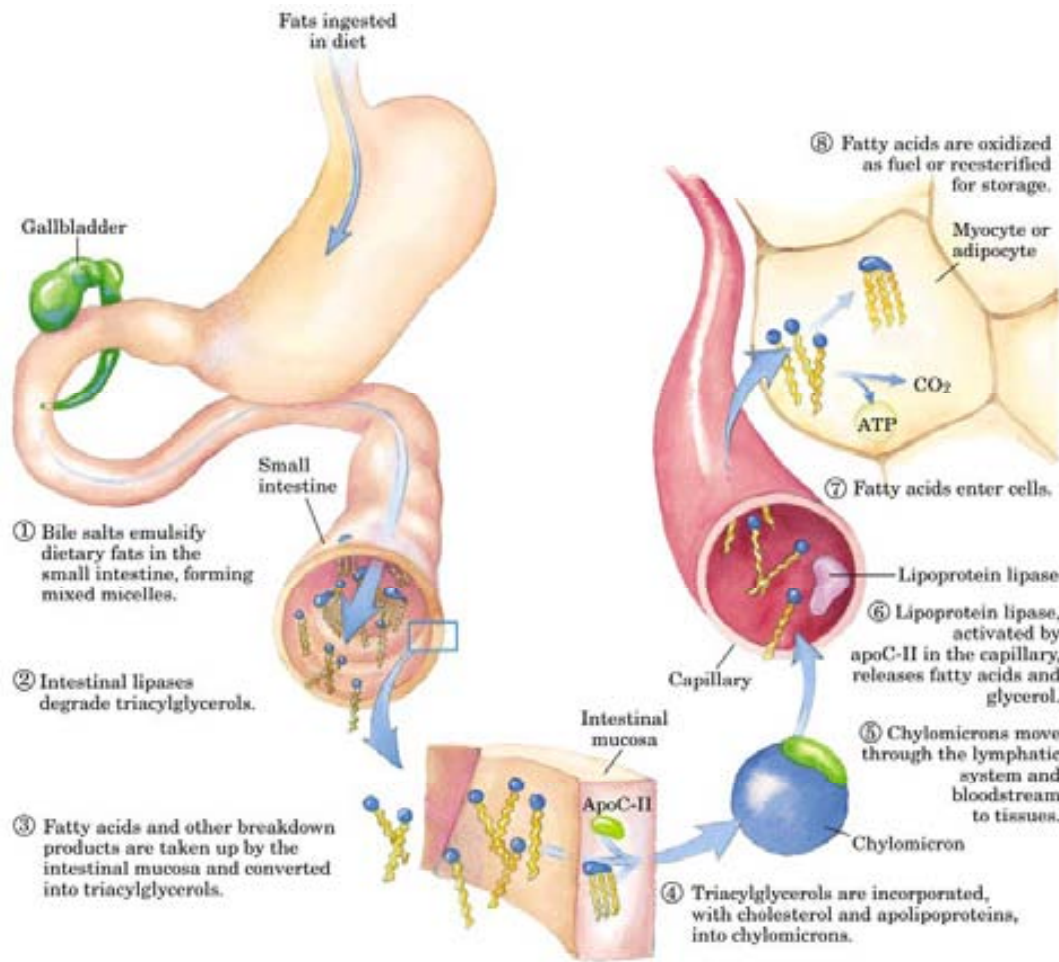


Figura 1.1. La digestión y la absorción de los lípidos tiene lugar en el intestino delgado, y los ácidos grasos liberados de los triglicéridos entran en el tejido adiposo o muscular.

En el hígado podemos tener AG de tres orígenes, en función del estado nutricional en el cual se encuentra el animal: 1) procedentes del alimento, 2) sintetizados *de novo*, 3) procedentes de la movilización desde los depósitos. Todos ellos pueden ser liberados a la circulación a través de la formación de las lipoproteínas plasmáticas de muy baja densidad VLDL (Figura 1.2). Las VLDL también son hidrolizadas por la LPL, suministrando lípidos a los diferentes tejidos. La pérdida parcial de TG debida a la acción de la LPL convierte las VLDL en VLDL residuales denominadas también lipoproteínas de densidad intermedia, (IDL), y estas a su vez tras la eliminación adicional de triglicéridos se transforman en lipoproteínas de baja densidad (LDL). El cuarto tipo principal de lipoproteínas, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), absorben el exceso de ésteres de colesterol y fosfolípidos y lo transportan hacia el hígado donde es convertido en sales biliares (Griffin y Hermier 1988).

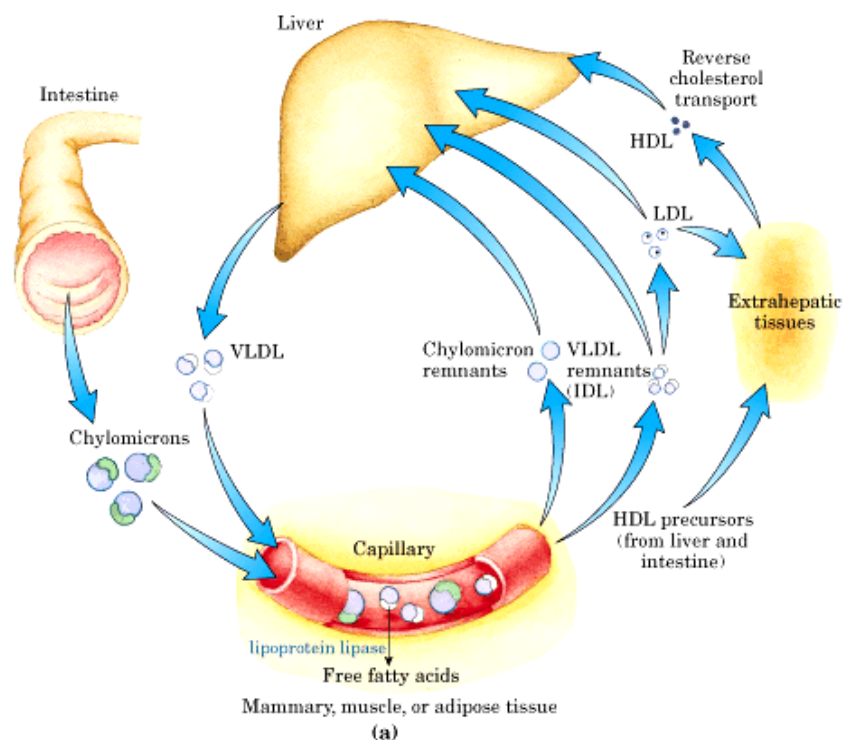


Figura 1.2. Transporte de lípidos. Los lípidos son transportados en el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas.

1.2.1. Importancia de la Lipoproteína Lipasa

La LPL es una enzima extracelular situada en la pared endotelial de los capilares sanguíneos. Como se ha mencionado anteriormente, su actividad es esencial para la entrada de los AG al interior de las células de los diferentes tejidos e interviene, de forma directa, en la regulación del metabolismo energético del organismo. Así, la ausencia o una baja actividad de esta enzima conlleva la aparición de trastornos como lipidemia y trigliceridemia (Bensadoun 1991). La LPL es sintetizada en diferentes tejidos, como el adiposo y muscular, y vehiculada hasta los capilares. Únicamente en las células del endotelio de los capilares podrá ser transformada en la forma activa. Esta fase de activación de la LPL es regulada de forma diferente en cada tejido, gracias a factores de regulación específicos para cada tejido (Fielding y Frayn 1998).

La acción de la LPL empezará en el momento en que sus receptores reconocen y se unen con la apoproteína C-II, la parte proteica de los PM y de las VLDL plasmáticas. De esta manera empezará la hidrólisis de los TG a glicerol y AG que acabaran entrando en las células de los tejidos diana. Las HDL contienen de forma mayoritaria

apoproteína-AI y, a diferencia del resto de lipoproteínas plasmáticas, no son hidrolizadas por la LPL.

El destino de los AG que han entrado a las células parenquimatosas dependerá del tipo de tejido y del balance nutricional del animal. Por ejemplo, en el caso del tejido adiposo, los AG que entran serán reesterificados en TG ejerciendo la función de reserva energética. En el caso del tejido muscular, los AG son, principalmente, oxidados aunque también pueden entrar a formar parte del “pool” temporal de TG de reserva, con el mismo destino final, ser oxidados para la obtención de energía. El trabajo de Lindberg y Olivecrona (1995) revela que en los pollos la mayor actividad LPL se detecta en el tejido adiposo (2000 mU/g de tejido), siendo inferior en corazón (400 mU/g respectivamente), músculo e hígado (aproximadamente 30 mU/g), lo que puede indicar una mayor importancia de la LPL en la formación de depósitos lipídicos corporales del animal.

Por lo que se refiere a la variación de la actividad de la LPL en función del estado nutricional del animal, se puede ver cómo existe una estrecha correlación con los requerimientos en energía de los diferentes tejidos. Por ejemplo, Cryer et al. (1976) midieron la actividad de la LPL en ratas en ayunas o alimentadas *ad libitum* y vieron que después de comer, la LPL aumentaba su actividad en el tejido adiposo mientras que la reducía en el músculo esquelético y corazón. Por el contrario, en animales en ayunas, la actividad de la LPL aumentaba en el músculo y disminuía en el tejido adiposo. Es decir, en este caso los AG se dirigen donde se necesitan y la LPL facilita su incorporación a las células.

En la bibliografía consultada son escasos los trabajos que estudian los diferentes factores que afectan la actividad de la LPL en pollos. El trabajo de Sato et al. (1999) apoya la hipótesis de que la presencia de AGS de cadena larga, concretamente palmítico (C16:0), en las lipoproteínas plasmáticas, aumentaba la actividad enzimática de la LPL en la grasa abdominal del pollo. Posteriormente, un trabajo más completo de los mismos autores (Sato y Akiba 2002) estudió tanto la actividad como la expresión génica de la LPL en el tejido adiposo. En concreto, llevaron a cabo 4 experimentos diferentes: 1) suministraron una dieta estándar y sacrificaron las aves a diferentes edades (2, 4, 6 y 8 semana de vida). 2) variaron el estado nutricional de animales de cuatro semanas de edad (alimentados con pienso estándar o en ayunas durante 48 horas). 3) suministraron

durante 7 días piensos con el 8% de aceite de oliva (rico en 18:1 n-9), aceite de girasol (rico en 18:2 n-6) o linaza (rico en 18:3 n-3) a pollos de 3 semanas de edad y por último, 4) utilizaron 3 emulsiones diferentes de ácidos grasos insaturados (18:1 n-9; 18:2 n-6; 18:3 n-3) y tras un ayuno de 48 horas, los alimentaron de forma forzada durante 12 horas. Llegaron a la conclusión de que la actividad hidrolítica de la LPL sobre las lipoproteínas plasmáticas depende, no tanto de la expresión génica del LPL, sino de las características bioquímicas del sustrato, es decir del tipo de lípidos y, en concreto, de los AG que contienen las lipoproteínas plasmáticas. Además, estos hallazgos sugieren que la LPL en pollo, comparados con los mamíferos, es menos sensible a variaciones de edad y factores nutricionales.

1.3. SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

Muchos estudios indican que mientras en mamíferos monogástricos, tanto el hígado como el tejido adiposo (tejido mamario durante la lactación) contribuyen a la lipogénesis, en aves el órgano principal responsable de la síntesis de AG es el hígado (Yeh y Leveille 1973; Saadoun y Leclercq 1983; Griffin y Hermier 1988, Bergen y Mersmann, 2005).

La síntesis de los AG no es simplemente la vía inversa a la oxidativa, sino que consta de un conjunto de reacciones distintas (Nelson, 1992; Nelson y Cox, 2000; Stryer et al., 2002). Algunas diferencias importantes entre ambas vías son:

1. La síntesis se produce en el citosol, a diferencia de la oxidación, que tiene lugar principalmente en la matriz mitocondrial.
2. Los intermediarios en la síntesis de los AG están covalentemente unidos a los grupos sulfhídrido de una proteína transportadora de grupo acilo (ACP, acyl carrier protein), mientras que los intermediarios en la degradación de los AG están ligados covalentemente al grupo sulfhídrido del coenzima A.
3. En los organismos superiores los enzimas de la síntesis de los AG están integrados en una única cadena polipeptídica llamada ácido graso sintetasa (FAS, fatty acid synthetase). Por el contrario, los enzimas de oxidación no parecen estar asociados entre sí.
4. La cadena del AG en formación se alarga por la adición secuencial de unidades de dos carbonos derivada del acetil coenzima A (acetil-CoA). En la oxidación, la

- cadena de AG se reduce de manera secuencial de dos unidades de carbono.
5. El reductor en la síntesis de los AG es el NADPH (Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato reducido), mientras que los reductores oxidantes en la degradación de los AG son el NAD^+ (Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato) y el FAD (Flavín Adenín Dinucleótido).
 6. La elongación por el complejo FAS se detiene en la formación del C16:0. La elongación posterior y la inserción de dobles enlaces se llevan a cabo por otros sistemas enzimáticos. El proceso de oxidación es completamente diferente y se explica con más detalle en apartados posteriores.

En la síntesis, el acetil-CoA puede derivar de la oxidación mitocondrial de los AG, de la descarboxilación oxidativa del piruvato (producto final de la oxidación de la glucosa) y del catabolismo de aminoácidos (principalmente glucogénicos: treonina, alanina y arginina), y por ello constituye un punto común entre el metabolismo lipídico y otras vías de almacenamiento y utilización de energía (glicólisis, ciclo del ácido cítrico, vía de las pentosas fosfato, metabolismo del glucógeno).

Cuando una célula tiene más combustible del necesario para sus necesidades energéticas, el exceso de acetil-CoA producido en las mitocondrias es transferido hacia el citosol y convertido en AG (síntesis de AG) y estos almacenados en forma de lípidos, especialmente TG. La membrana mitocondrial resulta impermeable a las moléculas de acetil-CoA, por lo tanto necesita ser transportados hacia el citosol en forma de citrato (Figura 1.3). El citrato se forma en la matriz mitocondrial por condensación de acetil-CoA con oxalacetato. Cuando alcanza concentraciones altas, el citrato es transferido hacia el citosol donde se escinde nuevamente en acetil-CoA por la acción de la ATP-citrato liasa.

Así pues, el acetil-CoA y el oxalacetato se transfieren desde la mitocondria hacia el citosol a expensas de la hidrólisis de una molécula de ATP. El oxalacetato formado en la transferencia de grupos acetilos al citosol debe ahora volver a las mitocondrias. Durante esta serie de reacciones necesarias para transferir el oxalacetato a las mitocondrias se genera la mayor parte del NADPH, necesario en la síntesis de AG durante la fase de elongación de la cadena carbonada. Primero el NADH reduce el oxalacetato a malato y, segundo, el malato se descarboxila mediante la enzima málico dependiente de NADP^+ . El piruvato formado en esta reacción difunde rápidamente en la

mitocondria, donde lo carboxila la piruvato carboxilasa hasta oxalacetato. En resumen, se genera un NADPH por cada acetil-CoA transferido desde la mitocondria hasta el citosol. Conforme van entrando los acetil-CoA al citosol de las células, empieza la síntesis de AG.

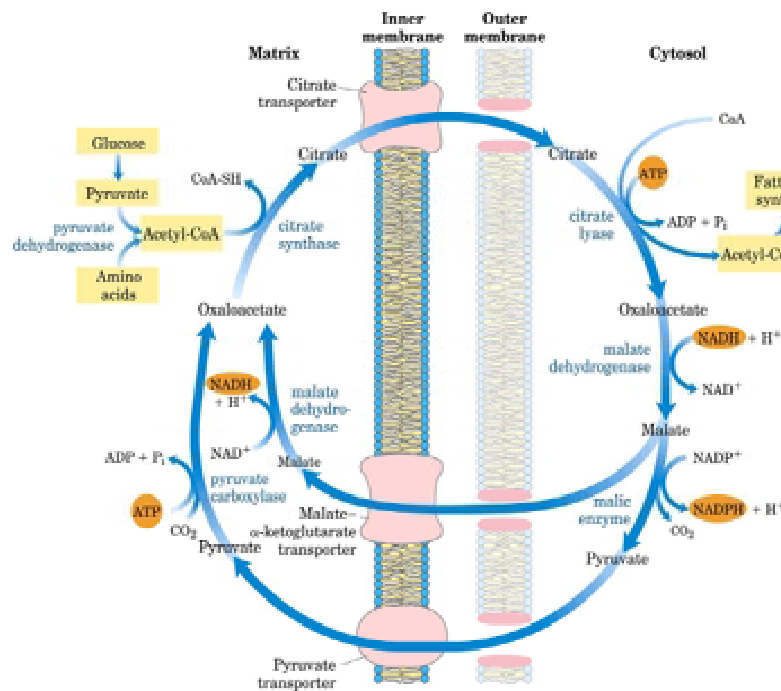


Figura 1.3. Lanzadera para la transferencia de grupos acetilo desde la mitocondria hasta el citosol. El piruvato procedente del catabolismo de los aminoácidos en la matriz mitocondrial, o de la glucosa por la glucólisis en el citosol, es convertido en acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos. El oxalacetato es reducido a malato, que vuelve a la matriz mitocondrial y es convertido a oxalacetato. Un destino alternativo para el malato citosólico es la oxidación por el enzima málico para generar NADPH citosólico; El piruvato producido vuelve a la matriz mitocondrial.

A continuación se explicará con más detalle los mecanismos de síntesis de los AG. El primer paso en la síntesis comienza con la carboxilación del acetil-CoA hasta malonil-CoA, gracias a la acción del enzima Acetil-CoA carboxilasa (ACC) y a expensas de la hidrólisis de una molécula de bicarbonato y una de ATP. Esta reacción irreversible es la etapa limitante de la síntesis de AG. La reacción general es la siguiente:



Tras esta primera reacción, se produce la elongación del Malonil-CoA por sucesivos enlaces con moléculas de Acetil-CoA. En cada paso, la cadena acilo graso se alarga dos

carbonos hasta la formación del ácido palmítico (C 16:0). El enlace de cada molécula de Acetil-CoA a la cadena carbonada de los AG, se produce en una reacción de cuatro etapas (Figura 1.5) y gracias a la acción del sistema enzimático ácido graso sintetasa (FAS) (Figura 1.4). El complejo enzimático FAS está constituido por un único polipéptido que contiene siete actividades enzimáticas, así como una actividad hidrolítica que escinde el AG en la parte correspondiente a la proteína portadora del grupo acilo (ACP: Acil Coupling Protein). Siete ciclos de condensación y reducción producen el palmítico de 16 carbonos. Por razones no bien conocidas, el alargamiento de la cadena se detiene generalmente en este punto, liberándose C16:0 de la molécula ACP, por acción de una actividad hidrolítica en el complejo de la sintetasa.

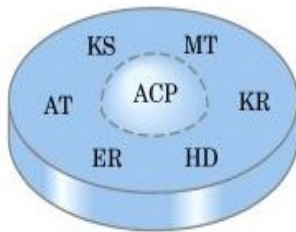


Figura 1.4. Estructura de la ácido graso sintetasa de vertebrados. Siete actividades en un único polipéptido grande. Enoil-ACP reductasa (ACP); Malonil-CoA-ACP transferasa (MT); β -Catoacil-ACP reductasa (KR); β -Hidroxiacil-ACP deshidratasa (HD); Enoil-ACP reductasa (ER); Acetil-CoA-ACP transacetilasa (AT).

La FAS requiere la presencia de la coenzima NADPH y H^+ para la síntesis, ya que transporta, en forma de poder reductor, la energía química necesaria para reducir los dobles enlaces de los intermediarios de este proceso. En total la síntesis de una molécula de ácido palmítico requiere 8 acetil-CoA y 14 NADPH, de los cuales 8 se generan de la transferencia de acetil-CoA desde la mitocondria al citosol mientras los restantes 6 NADPH provienen de la vía de las pentosas fosfatos.

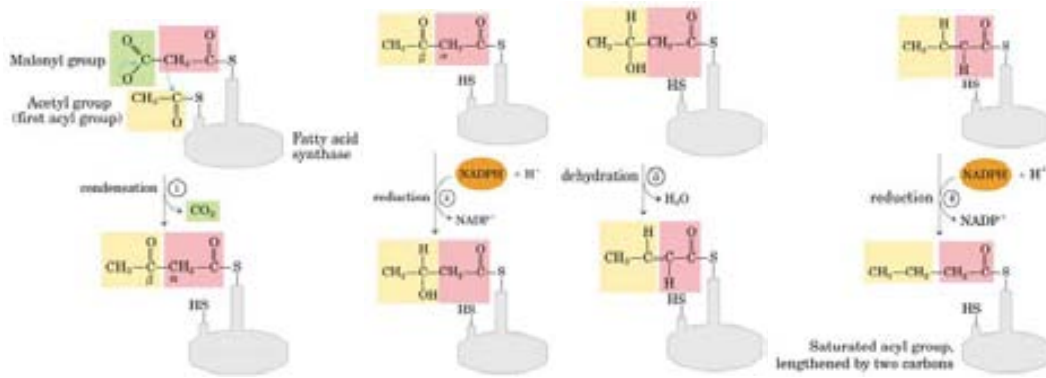


Figura 1.5. Secuencia de cuatro pasos utilizada para alargar en dos carbonos una cadena acil graso en crecimiento. Cada grupo malonilo y acetilo (o acilo más largo) es activado por un tioéster que lo une a la FAS. 1) El primer paso es una condensación del grupo acilo (sombreado de amarillo) y dos carbonos procedentes del Malonil-CoA (sombreado de rosa), con la eliminación de CO_2 del grupo malonilo (sombreado de verde). El resultado es la extensión de la cadena acilo en dos carbonos. 2), el grupo β -ceto de esta condensación se reduce a alcohol, 3) la eliminación de H_2O crea un doble enlace, y 4) el doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acil graso saturado.

La vía de las pentosas fosfato es una ruta catabólica en la cual la glucosa es degradada para la producción de NADPH y ribosa-5-fosfato. La función del NADPH es especialmente prominente en los tejidos animales que llevan a cabo activamente la biosíntesis de AG, tales como el hígado. Otros tejidos menos activos en la síntesis lipídica tales como el músculo esquelético, carecen de la ruta de las pentosas fosfato. La ribosa-5-fosfato es empleada en la síntesis de ácidos nucleicos.

Dentro de la vía de las pentosas fosfato, existen diferentes enzimas generadoras de NADPH. De gran importancia en mamíferos encontramos la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Sin embargo, en aves, los principales suministradores de NADPH son la enzima málico y la enzima isocitrato deshidrogenasa que actúan en la transferencia de acetyl-CoA de la mitocondria hacia el citosol (Asante y Bufield, 1988).

La acción de la enzima ácido graso elongasa es capaz de producir AG de cadena larga (por ejemplo el esteárico, C18:0) mediante la adición de malonil-CoA a la cadena recién sintetizada del palmitico. Gracias a la existencia de otras enzimas, las desaturasas de tipo 4, 5, 6 y 9, se pueden producir también ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) como el palmitoleico (16:1 n7) y oleico (18:1 n9), siendo, estas enzimas, capaces de añadir un doble enlace en los carbonos 4, 5, 6 ó 9 del extremo carboxilo. Los AG sintetizados en el hígado irán a constituir los TG. Los triglicéridos se forman por la

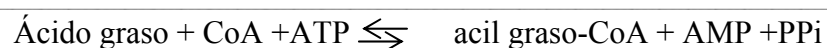
reacción de dos moléculas de acil graso-CoA con el glicerol 3-fosfato para dar lugar al ácido fosfatídico; éste es desforilado dando un diaglicerol y luego acetilado por una tercera molécula de acil graso-CoA para formar el TG. Este proceso está regulado por hormonas, principalmente por la insulina y glucagón.

Tanto en mamíferos como en aves carecen de enzimas para introducir dobles enlaces entre los átomos de carbono más allá de C-9 en la cadena del ácido graso. Por tanto no pueden sintetizar linoleico (18:2 n6) o linolénico (18:3 n3). Ambos son ácidos grasos esenciales que deben figurar en la dieta puesto que son requeridos por el organismo y no pueden sintetizarse por vía endógena. El linoleico y el linolénico son el punto de partida para la síntesis de toda una serie de ácidos grasos insaturados. Por ejemplo, el araquinoico (20:4 n6) derivado del linoleico, es a su vez una fuente de muchas moléculas-señal como las prostaglandinas.

Los triglicéridos sintetizados en hígado, como se ha descrito anteriormente, son vehiculados a la sangre en VLDL. Conforme van llegando AG de la ración al hígado, se activan los procesos de oxidación convirtiendo los AG en acetyl CoA. Un exceso de estas moléculas llega a producir la supresión de la síntesis *de novo* de AG por la inhibición de enzimas de síntesis como la ACC y la FAS (Nelson G.J. 1992).

1.4. OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Uno de los principales mecanismos de obtención de energía en forma de ATP para el organismo animal es la β -oxidación de los AG (Nelson, 1992; Nelson y Cox, 2000; Stryer et al., 2002). Las enzimas que intervienen en la oxidación de los AG en las células se localizan en la matriz mitocondrial. Los AG procedentes de la sangre penetran en el citosol, pero no pueden pasar directamente a través de las membranas mitocondriales, sino que deben sufrir tres reacciones enzimáticas previas. La primera de ellas está catalizada por una familia de isoenzimas presentes en la membrana mitocondrial externa, las acil-CoA sintetetasas, que llevan a cabo la reacción general:



Los éster de acil graso-CoA formados en la membrana mitocondrial externa no cruzan la membrana mitocondrial interna intactos. El grupo acilo graso se une transitoriamente

al grupo hidroxilo de la carnitina para formar acil-graso-carnitina (Figura 1.6).

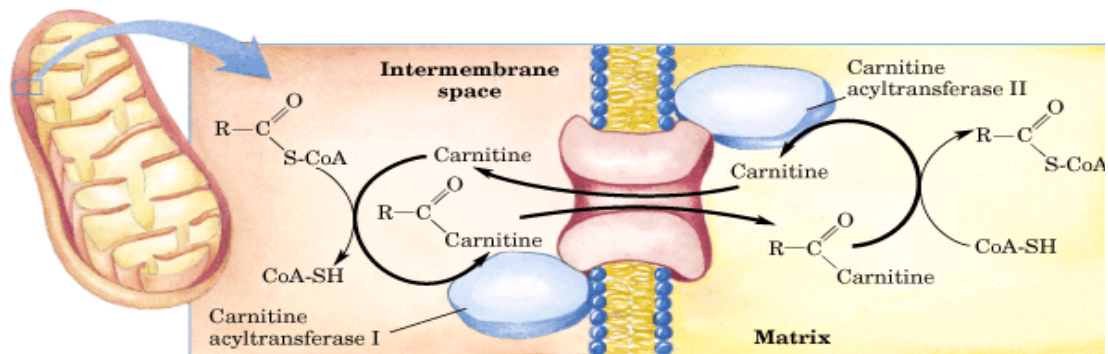


Figura 1.6. Entrada de los ácidos grasos en la mitocondria a través del transportador acil-carnitina/carnitina. El acilo graso-carnitina penetra en la matriz por difusión facilitada a través del transportador. En la matriz, el grupo acilo se transfiere al CoA mitocondrial, liberando carnitina que vuelve al espacio intermembranoso utilizando el mismo transportador. Los enzimas CPT I y II están unidos a las superficie externa e interna respectivamente de la membrana interna.

Esta transesterificación es catalizada por la carnitina palmitoil transferasa I (CPT I), en la cara exterior de la membrana interna mitocondrial. El éster acil-carnitina penetra a continuación en la matriz por difusión facilitada a través del transportador de acil-carnitina/carnitina de la membrana mitocondrial interna. En el tercer y último proceso de entrada, el grupo acilo graso es transferido enzimáticamente desde la carnitina a la coenzima A intramitocondrial por la acción de la carnitina palmitoil transferasa II (CPT II). El proceso de entrada mediado por la carnitina es el paso limitante de la velocidad de la oxidación de los AG en las mitocondrias y representa el punto más importante de regulación. De hecho, una vez que los acil graso-CoA entran en la mitocondria siguen obligatoriamente el proceso de β -oxidación, hasta acetyl-CoA. Una vez en la matriz mitocondrial, la oxidación de los AG tiene tres fases (Figura 1.7).

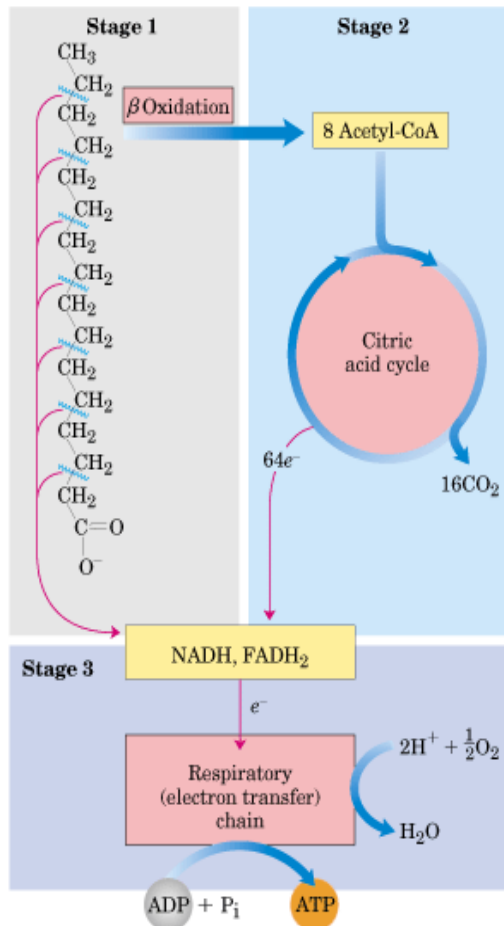


Figura 1.7. Fases de oxidación de ácidos grasos. Fase 1: oxidación de un ácido graso para generar residuos acetilos en forma de Acetil-CoA. Fase 2: los grupos acetilo se oxidan hasta CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Fase 3: los electrones derivados de la oxidación de la fase 1 y 2 se transfieren al O_2 a través de la cadena respiratoria mitocondrial proporcionando la energía necesaria para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa.

En la primera, la β -oxidación, los AG sufren la eliminación oxidativa de unidades sucesivas de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA, a partir del extremo carboxilo de la cadena del AG. Así por ejemplo, el ácido palmítico de 16 átomos de carbono, es sometido 7 veces a esta secuencia oxidativa, perdiendo en cada paso 2 carbonos en forma de acetil-CoA. Tras los 7 ciclos, los dos últimos carbonos del palmitato (originalmente C15 y C16) quedan en forma de acetil-CoA. Globalmente, se convierte la cadena de 16 carbonos del palmitato en 8 grupos acetilo de dos carbonos, es decir en 8 moléculas de acetil-CoA. La formación de cada acetil-CoA exige que las enzimas deshidrogenasas eliminen 4 átomos de H (dos pares de electrones y cuatro H^+). Hacen falta cuatro reacciones para eliminar cada una de las unidades de acetil-CoA del extremo carboxilo de un acil graso CoA saturado (Figura 1.8):

- (1) deshidrogenación de los carbonos α y β (C-2 y C-3) por acil graso-CoA deshidrogenadas unidas a FAD,
- (2) hidratación del doble enlace *trans*- Δ^2 resultante por la enoil-CoA hidratasa,
- (3) deshidrogenación del L- β -hidroxiacil-CoA resultante por la L- β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa unida a NAD y,

- (4) rotura por la tiasa y en presencia de CoA del β -cetoacil-CoA acortado en dos carbonos. El acil graso-CoA acortado entra de nuevo en la secuencia.

En la segunda fase de la oxidación de los AG, los grupos acetilo del acetyl-CoA se oxidan hasta CO_2 a través del ciclo del ácido cítrico, que también tiene lugar en la matriz mitocondrial. El acetyl-CoA procedente de la oxidación de los AG entra de este modo en una ruta oxidativa final común junto con acetyl-CoA procedente de la glucosa, vía glucólisis y oxidación del piruvato.

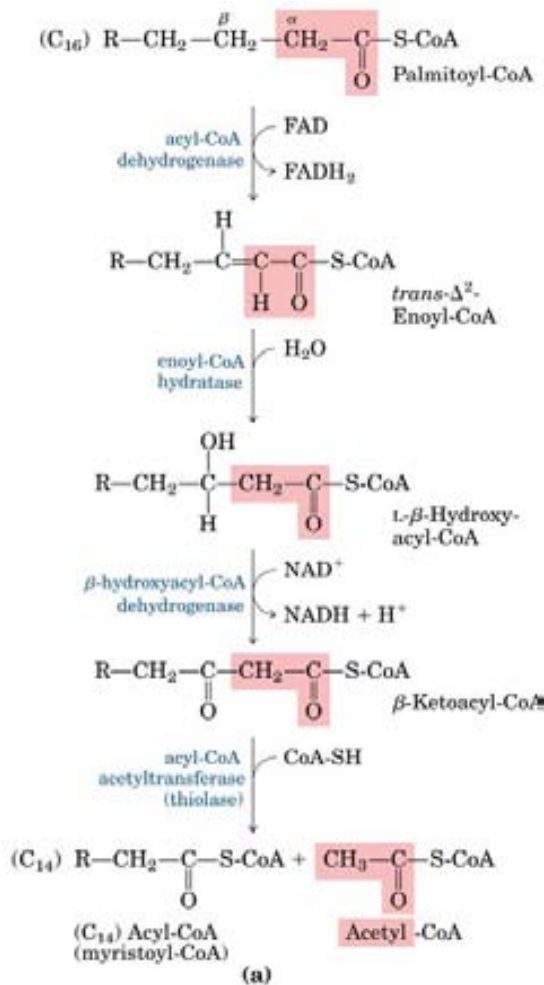


Figura 1.8. Ruta de la β -oxidación. En cada paso a través de una secuencia de cuatro pasos, un grupo acetilo (en rosa) es eliminado en forma de acetyl-CoA del extremo carboxilo de la cadena del ácido graso.

Tanto en la primera como la segunda fase de la oxidación de los AG, los agentes reductores NADH y FADH₂ se reducen, donando sus electrones a la cadena respiratoria mitocondrial. Dichos electrones son transferidos al oxígeno, proporcionando la energía necesaria para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa (tercera y última fase). De este modo la energía liberada de los AG se conserva en forma de ATP.

La secuencia de oxidación de los AG descrita anteriormente es típica de los AGS (que poseen solamente enlaces sencillos en su cadena carbonada). Sin embargo una proporción importante de los AG de los TG y fosfolípidos de origen animal y vegetal, tienen uno o más enlaces dobles. Para su oxidación los AGPI requieren la acción de otras dos enzimas: la enoil-CoA isomerasa y la 2,4-dienoil-CoA reductasa.

Además de las mitocondrias existen otros compartimientos celulares donde se lleva a cabo la oxidación de AG hasta acetyl-CoA a través de rutas similares (Figura 1.9).

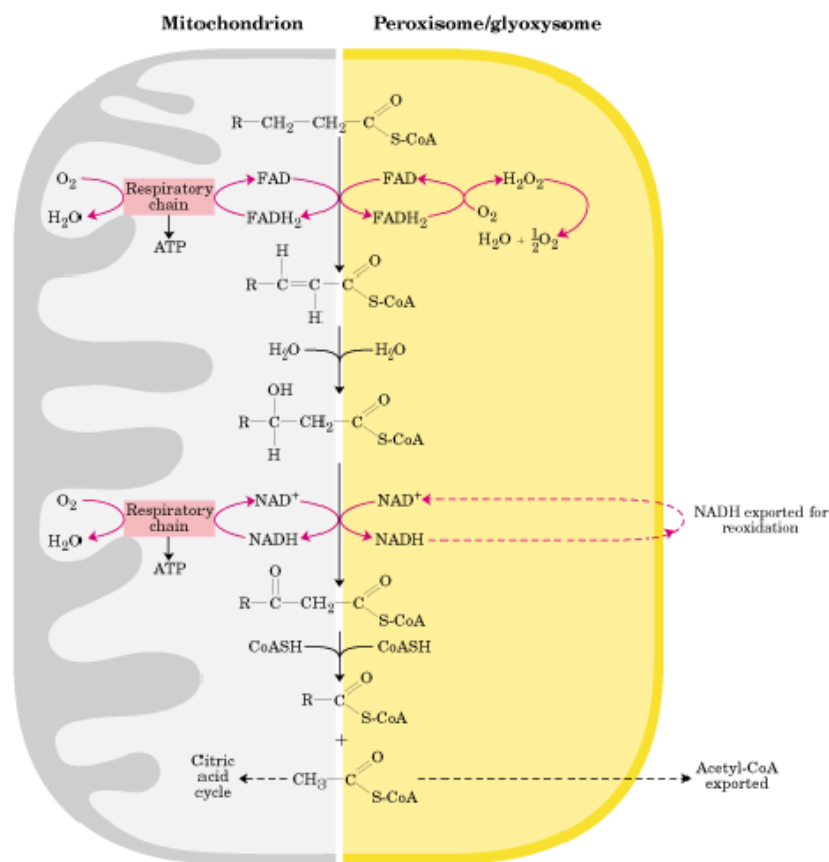


Figura 1.9. Comparación de la β -oxidación en mitocondrias y en peroxisomas. El sistema peroxisómico difiere del sistema mitocondrial en dos aspectos: 1) en el primer paso oxidativo los electrones pasan directamente al O_2 , generando H_2O_2 . 2) El NADH formado en el segundo paso es exportado desde los peroxisomas al citosol, donde sigue oxidándose en el ciclo del ácido cítrico.

Los peroxisomas son orgánulos rodeados de membrana presentes tanto en células animales como vegetales (en este caso se denominan glioxisomas), en los que en el primer paso de la vía de oxidación de AG utiliza oxígeno molecular como último

aceptor de electrones en vez del FAD. Finalmente, por cada acetyl-CoA obtenido de la oxidación de un AG en los peroxisomas la energía liberada durante la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no se conserva como ATP sino que se disipa en forma de calor. En la mitocondria, en cambio, los electrones eliminados en el primer paso de la oxidación de AG pasan directamente a través de la cadena respiratoria hacia el O_2 para producir H_2O . Este proceso está acompañado de la síntesis de tres moléculas de ATP, comparado con las dos moléculas de ATP producida en los peroxisomas. En la bibliografía no se encontraron trabajos dirigidos al estudio del efecto del diferente grado de insaturación de la ración de aves sobre la oxidación de los AG en los peroxisomas.

En situación de ayuno o dieta hipocalórica, se produce una movilización de AG desde los depósitos lipídicos con objeto de disponer de una fuente de energía (Figura 1.10).

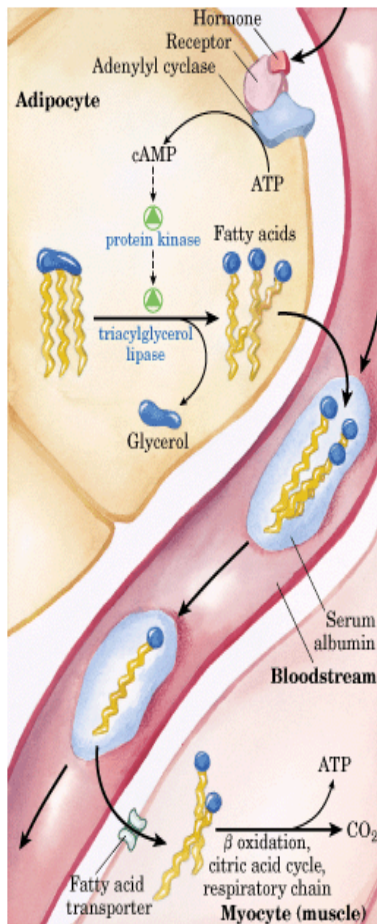


Figura 1.10. Movilización de ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo. Niveles bajos de glucosa en sangre activan la movilización de los triglicéridos a través de la acción de la adrenalina y glucagón.

La liberación de los AG del tejido adiposo es activada por un mecanismo complejo, principalmente, por cambios de los niveles de glucosa en la sangre. Tras agotarse las reservas de glucógeno almacenadas en el hígado, disminuyen los niveles de glucosa en

sangre y se producen cambios en los niveles de las hormonas insulina y glucagón. El glucagón, conjuntamente con la adrenalina, activa la enzima adenil ciclasa de la membrana plasmática de los adipocitos. Una proteína quinasa dependiente de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) fosforila y activa la enzima triacilglicerol lipasa que procede a hidrolizar los TG almacenados. Los AG libres liberados del tejido adiposo son transportados por la albúmina plasmática al resto de tejidos, incluido al hígado. En los hepatocitos conforme va aumentando la conversión de los AG en acetil-CoA, se activan los mecanismos de inhibición de la síntesis *de novo*, idénticos a los que se producen cuando los acetil-CoA derivan de la degradación de los AG de la ración.

1.5. EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO

Las hormonas tiroideas tienen múltiples efectos sobre el metabolismo y el desarrollo celular (crecimiento y maduración celular). En animales homeotermos, son capaces de regular el metabolismo basal y son esenciales para mantener la temperatura corporal elevada y constante. También intervienen en el metabolismo lipídico, en el que tienen un efecto de tipo bifásico: cuando están presentes en bajas concentraciones fisiológicas tienen un efecto anabólico, mientras que a elevadas concentraciones, tienen efectos de tipo catabólico (Decuypere et al. 2005).

La glándula tiroidea está constituida por múltiples folículos rodeados por una sola capa de células y llenos de un material proteico llamado coloide. Las principales hormonas tiroideas secretadas, la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3) son sintetizadas en el coloide por yodación y condensación de moléculas de tirosina. Posteriormente, se unirán a través de enlaces peptídico a la tiroglobulina. La tiroglobulina es una glucoproteína sintetizada por las células tiroideas y secretada por exocitosis hacia el coloide. Para que la T4 y T3 sean liberadas a los capilares sanguíneos, el coloide es captado por las células tiroideas y se hidrolizan las uniones pépticas con la tiroglobulina (Figura 1.11).

Las hormonas tiroideas se pueden encontrar en el organismo en forma libre, o unidas a proteínas. La forma libre es la forma fisiológicamente activa, tanto si se encuentra en el torrente sanguíneo como dentro de los tejidos. Existe un balance entre la fracción de hormonas libre y la unida a proteínas. Al unirse a las proteínas, las hormonas tiroideas

quedan almacenadas hasta su liberación en forma libre. Las proteínas plasmáticas unidas a hormonas tiroideas son la albúmina, prealbúmina y globulina. En aves la mayor parte de T4 y T3 circulante está unida a la albúmina (Davison et al. 1978).

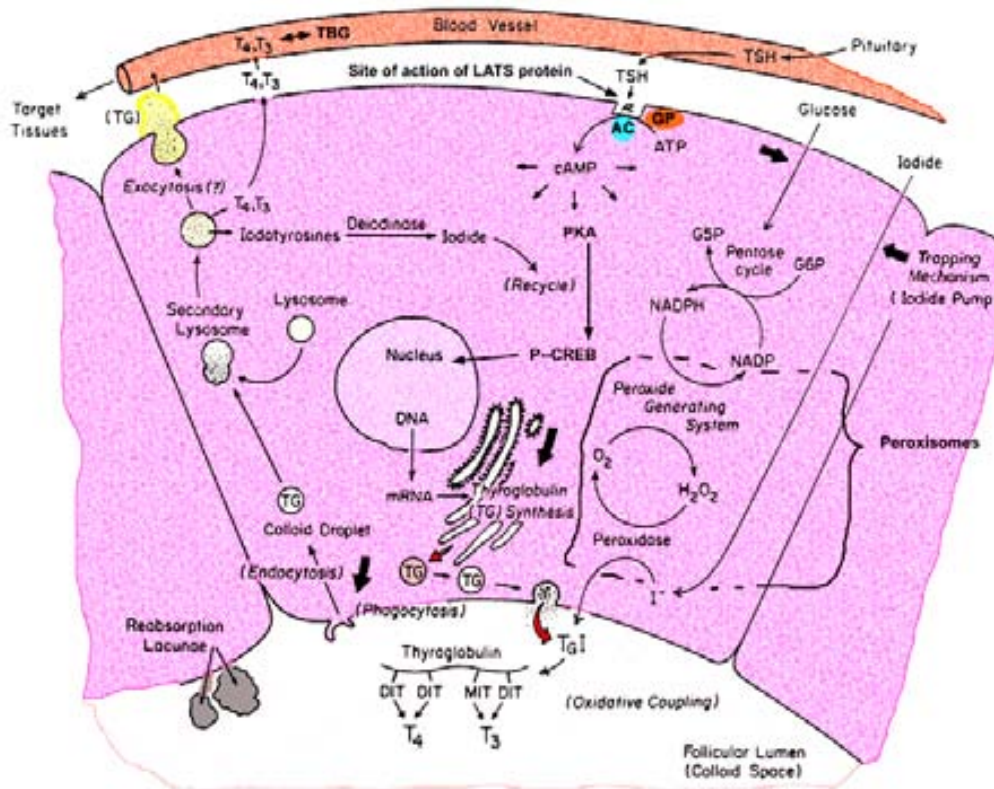


Figura 1.11. Síntesis y liberación de hormonas tiroideas.

Cuando disminuye la concentración de hormonas tiroideas libres circulantes, se estimula la secreción en la hipófisis anterior de la hormona tirotrópica (TSH), que dará lugar a un incremento de la producción de hormonas tiroideas libres. Contrariamente, un aumento de los niveles circulante de T4 y T3 libre, inhibe la secreción de TSH por retroacción inhibitoria directa.

En muchas especies, incluidas las aves, el tipo predominante de hormona secretada es la T4. En realidad, esta hormona se considera una parahormona, ya que se convierte en la forma T3 más bioactiva (Reyns et al. 2003). El complejo enzimático responsable de dicha transformación es la yodotironina desyodinasas, presente en muchos tejidos extratiroideos. Este complejo enzimático es responsable también de la inactivación por desyodación de la T4 en T3 inversa (rT3) y de la T3 en diyodotironina (T2) (Van der

Geyten et al. 1999).

El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas es diferente del de otras hormonas porque actúan en el núcleo de las células alterando la expresión génica (Figura 1.12). Una vez entran en la célula diana, estas hormonas pasan a través de la membrana plasmática por difusión simple y una vez en el núcleo, se unen a proteínas receptoras específicas (REC) provocándoles un cambio de conformación. De esta forma las REC son capaces de interactuar con secuencias de DNA reguladoras específicas (elementos de respuesta hormonal, HRH), y se produce una alteración de la expresión génica, aumentando o reduciendo la expresión de genes específicos (Viguerie y Langin 2003).

En la bibliografía encontramos diversos trabajos dirigidos a conocer el grado de afinidad de ciertos genes para la hormona T3, entre ellos destacamos los relacionados con el metabolismo lipídico. En cuanto a su relación con la síntesis de AG, la T3 es responsable de mantener la expresión de la FAS en hígado de pollo, a niveles normales (Kameda 1995). De hecho, en situaciones de hipotiroidismo, la expresión de la FAS se ve inhibida. También se ha descrito que la T3 regula la expresión del enzima málico (Goodridge et al. 1998). Además, existen indicios *in vitro*, de que los AG de cadena larga podrían interferir en la unión de la T3 con el DNA y reducir la expresión del enzima málico, clave para la síntesis de AG (Thurmond y Goodridge 1998; Rosebrough et al. 2007, 2009).

Según la bibliografía encontrada, la T3 tiene efecto no solamente sobre enzimas de síntesis, sino también sobre enzimas de oxidación de AG (Jackson-Hayes et al. 2003). Tanto la expresión génica como la actividad enzimática de la carnitina palmitoil transferasa I (CPT I) aumenta en animales en situación de hipertiroidismo.

También es importante destacar las investigaciones de Collin et al. (2003, 2005) que dirigen su atención hacia el estudio de las proteínas desacopladoras en aves (Avian Uncoupling Protein, avUCP). Estas proteínas provocan que la energía de la oxidación mitocondrial no se conserve en forma de ATP, sino que se disipe en forma de calor para el mantenimiento de la temperatura corporal. Los resultados de estos autores demostraron, por un lado, que en las mitocondrias de muchos tejidos, existen sitios de enlace donde la T3 induce la transcripción de las proteínas desacopladoras. Por otro lado, se observó que en animales expuestos a bajas temperaturas, la inducción de la expresión

de la avUCP está asociada a un incremento de las concentraciones plasmáticas de T3 y a una mayor producción de calor. En cuanto a la implicación de los AG de la ración, existen trabajos en ratas (Baillie et al. 1999) que demuestran que la ingestión de AGPI (p.e. aceite de pescado) aumenta la expresión de genes que codifican las proteínas desacopladoras dando como resultado un menor depósito lipídico, debido a un aumento en la producción de calor y a una reducción en la producción de ATP. La avUCP encontrada en las aves es muy parecida a la de las ratas (Raimbault et al. 2001), por lo tanto podemos pensar que tiene un papel importante en la desviación hacia la termogénesis de la energía producida por la oxidación de los AGPI (Takeuchi et al. 1995).

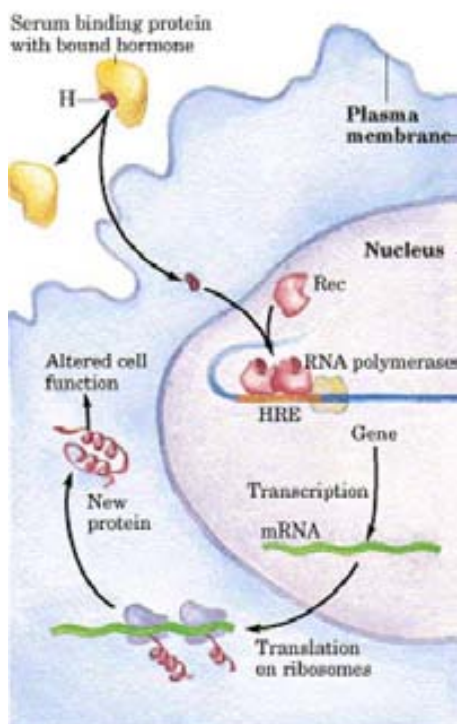


Figura 1.12. Mecanismo de acción de la hormona tiroidea. La hormona es transportada al tejido diana en proteínas séricas. Difunde a través de la membrana plasmática y se une en el núcleo a su receptor proteico específico (Rec). La unión de la hormona cambia la conformación del Rec y se une a regiones reguladoras específicas del DNA, llamadas elementos de respuesta a hormonas (HRE) adyacentes a los genes específicos. La unión regula la transcripción de los genes, aumentando o disminuyendo la velocidad de formación de RNA mensajero. Se produce una respuesta celular inducida por la hormona.

En conclusión, las hormonas tiroideas, y en concreto la T3, representan un parámetro importante de estudio por su implicación directa en el metabolismo, y en concreto, por su sistemas de acción sobre fracciones de DNA de genes del metabolismo lipídico.

1.6. LA GRASA COMO FUENTE DE ENERGIA

La grasa contiene dos veces y media más energía que los hidratos de carbono (9 vs. 4 kcal/g, respectivamente); esta diferencia es debida a su mayor contenido en carbono y hidrogeno con respecto al oxigeno, lo cual significa que están menos oxidadas, y son

por lo tanto capaces de producir más energía cuando se oxidan. Es decir, la incorporación de grasa en la ración, en combinación con otros ingredientes, es necesaria para alcanzar niveles elevados de energía, pienso más concentrados, y lograr así un rápido crecimiento de los animales.

El método más sencillo para determinar la concentración energética de la ración es la valoración de la energía bruta (calor de combustión). En general, la energía bruta (EB) de las grasas utilizadas en nutrición animal varía muy poco, con un valor aproximado de 39,33 kJ/kg. Este valor (EB) tiene un significado nutricional relativo ya que dependiendo de las interacciones con otros nutrientes de la ración y la evolución de los procesos de digestión, absorción y metabolismo, el animal podrá obtener una mayor o menor cantidad de energía para su mantenimiento, crecimiento y producción según sea el caso.

Los pollos son alimentados normalmente a voluntad con el objetivo de alcanzar los máximos ritmos de producción de carne. Viendo la contribución energética de las materias grasas es lógico que exista un gran interés por evaluar su valor nutritivo y en concreto la utilización final de la energía por parte del animal. En aves la medida de la energía metabolizable aparente (EMA) es la más adecuada para expresar el contenido energético de las raciones. Este valor indica la cantidad de energía que el animal aprovecha de la ración tras los procesos metabólicos y se obtiene restando a la EB total ingerida, la EB total excretada tanto fecal como urinaria, y refiriendo los resultados a kg de alimento consumido (balance *in-vivo*). Dentro del sistema de EM, la EMA no incluye las correcciones por pérdidas endógenas de energía a diferencia de la EM verdadera (EMv). Además, la EMA se puede expresar con o sin corrección para una retención de nitrógeno nula (Francesh et al. 1999).

En los años 70-80 se hicieron grandes esfuerzos para determinar la EMA de los ingredientes utilizados en nutrición animal (Miller et al. 1974; Mollah et al. 1983). En general, estos autores observaron que el valor de EMA refleja sobretodo la contribución energética de los ingredientes mayoritarios (por ejemplo maíz) que componen la ración. En cambio no sucede lo mismo en ingredientes que entran a formar parte de la dieta a bajos niveles de inclusión, como son las grasas (Kussaibati et al. 1982). Si lo que se pretende es valorar un ingrediente individual, en primer lugar, aparecen problemas derivados de la no aditividad de los valores energéticos y de la influencia de los

distintos componentes de la dieta sobre la digestibilidad de los nutrientes del ingrediente que queremos valorar (Miller, 1974). Por otro lado y dependiendo del tipo de ingrediente, no es posible su inclusión a altos niveles en la dieta, debido a problemas de inapetencia (Kohler y Kuzmicky, 1970) o desequilibrios nutricionales (Sibbald y Slinger, 1962, 1963).

La difícil determinación del valor energético real de la grasa obliga a realizar una estimación del mismo. Los métodos experimentales *in vivo* más utilizados para la estimación del valor en EMA de las grasas, ampliamente descritos en la bibliografía, son los siguientes:

1. Sustitución: Obtención de la EMA de la grasa por diferencia entre la EMA de una dieta basal y la EMA de la misma dieta con grasa añadida.
2. Digestibilidad: Obtención de la EMA de la grasa añadida a partir de los valores de digestibilidad de la grasa añadida multiplicando por su EB.
3. Regresión: Extrapolación al 100% de inclusión de grasa, a partir de los valores de EMA obtenidos del balance *in-vivo* de pollos que han consumido raciones con niveles crecientes de grasa añadida.

Por lo que se refiere a métodos *in-vitro*, se tienen que basar en el grado de relación entre los resultados obtenidos *in-vitro* e *in-vivo* sobre ingredientes o raciones idénticas. En aves, los métodos indirectos o *in-vitro* se han orientado hacia la simulación de los procesos de digestión (Sakamoto et al. 1980; Clunies y Leeson 1984; Sibbald et al. 1980; Valdes y Leeson, 1992a), al establecimiento de ecuaciones de predicción y a la aplicación de la técnica NIR (espectroscopia en el infrarrojo cercano; Valdes y Leeson, 1992b; Pérez-Vendrell et al 1992).

El principal interés de los estudios se centra en atribuir un valor diferente de EMA a cada tipo de grasa de uso en nutrición animal. En primer lugar, existe una correlación positiva entre el grado de insaturación y su EMA. Es decir, conforme aumenta la relación insaturados:saturados de la grasa, aumenta el valor de EMA (Tabla 1.1; Blanch et al., 1995).

Tabla 1.1. Valores de energía metabolizable aparente (EMA) y proporción de AGPI de diferentes fuentes de grasas para pollos de carne (Blanch et al., 1995).

Fuente grasa	EMA (MJ/kg)	AGPI (g/100g)
Sebo	42,40	2,53
Manteca	42,99	9,37
Aceite de palma	43,59	7,93
Aceite de soja	44,09	61,82
Aceite de linaza	49,79	68,71

En segundo lugar, está bien establecido que el comportamiento de la grasa adicionada parece depender de la composición nutritiva de la dieta base a la que se adiciona, mejorando la digestibilidad de otros nutrientes. Esto hace que la contribución energética de la grasa sea muy difícil de cuantificar puesto que su valor varía no solo dependiendo de su perfil en AG sino también de su nivel de adición a la dieta y del tipo de dieta base. En ocasiones los estudios encontraban valores de EMA superiores al valor de EB de la grasa. Este efecto, denominado efecto extra-metabólico, se puede diferenciar en dos fenómenos separados: sinergismo entre la grasa basal y la grasa añadida y efecto de la grasa añadida sobre la absorción de la fracción no lipídica de la dieta basal. Por lo que se refiere al sinergismo, diversos estudio han demostrado cómo los AG insaturados promueven la incorporación de los AGS a miscelas mixtas, mejorando su solubilización en el medio y por tanto su disponibilidad (Sibbald and Slinger 1963).

1.6.1. Métodos para medir la producción de calor y la retención de energía

En general, después de la ingestión de alimento, el animal no solamente pierde la energía química contenida en sus excretas (líquida y sólidas), sino también en forma de calor. El calor que el animal desprende pasa al medio que le rodea, bien directamente por radiación, conducción y convección (perdidas sensibles), o bien indirectamente asociado a vapor de agua (perdidas latentes). Por ejemplo, cuando se alimenta un animal sometido a ayuno, en el espacio de pocas horas su producción de calor (PC) aumenta por encima del nivel representado por el metabolismo de ayuno. A este aumento se le conoce como incremento térmico (IT) o efecto dinámico específico del alimento. La causa principal del IT es la ineficiencia energética de las reacciones por las que los

nutrientes ingeridos son sucesivamente absorbidos y metabolizados.

Como se observa en la Figura 1.13, partiendo de que la PC es mínima en un animal en ayunas, conforme aumenta la ingestión de EMA inicialmente los nutrientes absorbidos se destinan a sustituir las reservas corporales destinadas a mantener la temperatura corporal hasta que llega un punto en que la ingestión de EMA permite mantener el balance de energía igual a cero: este punto se conoce como mantenimiento. Sucesivos aumentos de ingestión de EMA dan lugar a retención alta de energía y sucesivos aumentos en la PC. En definitiva, en un animal en producción (p. e. crecimiento) la ingestión de EMA se reparte en cuatro componentes: Energía neta (EN) para mantenimiento (ENm) o metabolismo de ayuno, incremento térmico de mantenimiento (ITm), energía neta para producción (ENp) e incremento térmico de producción (ITp).

Cuando a la EMA procedente de un alimento le restamos el ITm y el ITp, nos queda la EN. La EN de un alimento es aquella que se encuentra disponibles para fines útiles, o sea para el mantenimiento orgánico (ENm) y para la distintas formas de producción (ENp). La ENm se usa para producir trabajo y abandona el organismo en forma de calor. La ENp, que en el caso de los pollos de carne es la fracción de energía destinada al crecimiento, se almacena en el organismo, y se denomina energía retenida (ER). La ER se deposita en el animal tanto en forma de proteína como de grasa.

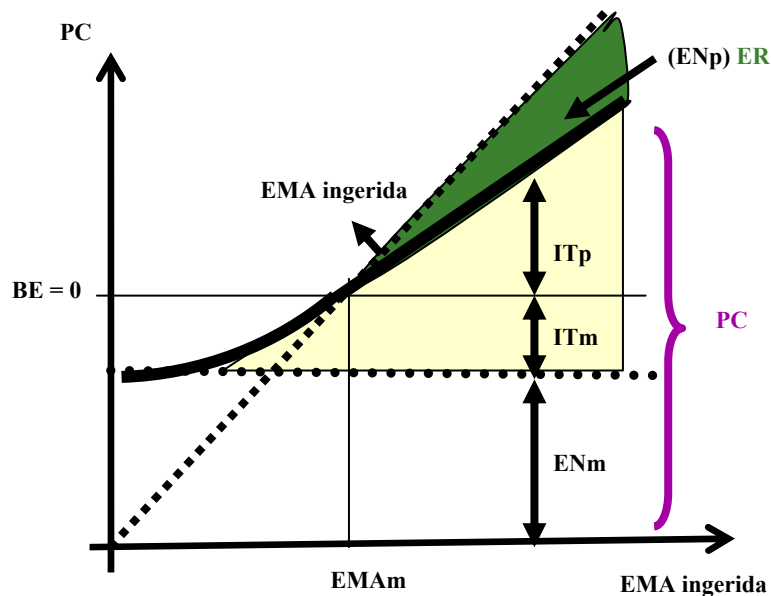
Dentro de este esquema de partición de la EMA en el cuerpo, es importante destacar que solamente el IT representa un despilfarro de energía y es el único que puede ser considerado como un gravamen directo sobre la energía del alimento. La energía empleada en el mantenimiento del organismo, aunque no sea retenida (ER), representa la energía que ha sido utilizada realmente por el animal.

La eficiencia de utilización de la EMA (*kg*) se define como la fracción de EMA que se recupera en forma de EN, ya sea ENm o ER, y su determinación requiere conocer, para varios niveles de la EMA ingerida, bien la EN retenida o bien la PC.

Por lo que se refiere a la PC, se puede determinar por métodos físicos mediante calorimetría directa o indirecta. La metodología mas comúnmente utilizada es la calorimetría indirecta y dentro de ella las pruebas de intercambio respiratorio para lo cual se precisa una cámara de respiración en sistema de circuito cerrado (Lachica et al.,

1995) o en cámara de circuito abierto (Aguilera y Prieto, 1985, 1986).

Figura 1.13. Producción de calor (PC) en función de la energía metabolizable aparente (EMA) ingerida: Partición de la energía.



La teoría del intercambio respiratorio asume que el organismo obtiene la energía de hidratos de carbono, lípidos y proteínas y los transforma en calor mediante su oxidación completa hasta CO_2 , H_2O y compuestos nitrogenados excretados por la orina (Kleiber, 1961; Blaxter 1962, 1967). A través de los conocimientos de los restos metabólicos se puede estimar la PC conociendo el consumo de O_2 y la producción de CO_2 , CH_4 y nitrógeno urinario (urea y ácido úrico principalmente).

En el sistema de circuito cerrado el aire sale de la cámara hacia los analizadores de gases y vuelve nuevamente a ella, formándose un circuito cerrado cámara-analizadores de gases. La actividad metabólica del animal alojado en la cámara produce un aumento en la concentración de CH_4 y CO_2 , a la par que descende la de O_2 . Estos cambios en composición son detectados continuamente y cuantificados mediante procedimientos físicos de análisis al inicio y final del ensayo. El sistema permite realizar un elevado número de ensayos durante periodos de tiempo necesariamente cortos para así evitar que la concentración de CO_2 en el interior de la cámara sobrepase el 1 %, lo que causaría trastornos respiratorios al animal. Al final de cada periodo la cámara ha de abrirse para renovar el aire de su interior. La diferencia entre el volumen inicial y el

volumen final de CH₄, CO₂ y O₂ en la cámara proporciona una medida del CH₄ y CO₂ producidos y del O₂ consumido por el animal.

En el sistema de circuito abierto, aire fresco del exterior penetra continuamente en la cámara como resultado de la presión negativa originada en su interior gracias a la acción de una bomba. El mismo flujo de aire puede ajustarse para que se alcance en el interior de la cámara un nivel de CO₂ algo inferior al 1 %. Una muestra alícuota del aire de salida es dirigida hacia la unidad de medida del equipo para un continuo registro de su composición.

Ambos sistemas, tanto el de circuito cerrado como el de circuito abierto, están equipados con indicadores de presión absoluta, temperatura seca y humedad absoluta y son normalmente controlados por un ordenador central.

A partir de los datos de producción de CO₂ y consumo de O₂ de los animales alojados en las cámaras de respirometría, se puede calcular el cociente respiratorio (CR) como la relación entre el volumen de dióxido de carbono producido y el volumen de oxígeno consumido:

$$\text{CR} = \frac{\text{CO}_2 \text{ producido (l)}}{\text{O}_2 \text{ consumido (l)}}$$

Es preciso tener en cuenta que los animales no obtienen la energía de carbohidratos o de grasa únicamente, o de una mezcla de ambos sino que también oxidan proteína (en teoría la oxidación de 1 g de mezcla de proteína requiere 0,96 l de O₂ y desprende 0,77 l de CO₂ y 4,3 Kcal).

El CR que se obtiene una vez se ha sustraído el O₂ consumido y el CO₂ producido por la oxidación de las proteínas se conoce con el nombre de CR no proteico. Este CR es igual a 1 cuando la energía obtenida por el animal procede enteramente de la oxidación de carbohidratos. Es decir, la reacción general para la oxidación de un hidrato de carbono, tal como la glucosa, es de 6CO₂ / 6O₂. Por otro lado, el CR es igual a 0,70 cuando la energía obtenida por el animal procede únicamente de la oxidación de la grasa. Es decir, la reacción general para la oxidación de un ácido palmitico (C 16:0), tomado como ejemplo de nutriente, es de 51 CO₂ / 72,50 O₂. Como se ha mencionado anteriormente,

valores intermedios entre 1 y 0,70 indican la oxidación de distintas proporciones de grasa y carbohidratos oxidados

Conocida la cantidad de O₂ consumido se recurre a estimar la cantidad de calor liberado a través del equivalente térmico del O₂ que varía entre 5,05 Kcal/l cuando se oxidan únicamente carbohidratos y 4,69 kcal/l cuando se oxidan únicamente lípidos. Con todo, la PC se estima mediante la fórmula de Romijn y Lokhorst (1961), y modificada posteriormente por Brouwer (1965). A partir de los datos obtenidos en cámara de producción de CO₂ y consumo de O₂ de los animales alojados en las cámaras de respirometría, se puede calcular la PC de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$PC \text{ (kJ)} = 16,18 \text{ O}_2 \text{ (l)} + 5,02 \text{ CO}_2 \text{ (l)} - 1,20 \text{ N (g)}$$

En el caso específico de las aves, la contribución del nitrógeno urinario en el cálculo de la PC es normalmente inferior al 0,3% (Romijn y Lokhorst, 1966), por tanto puede no tenerse en cuenta su contribución en este tipo de ensayos.

Son pocos los trabajos dirigidos a evaluar el CR y la PC en pollos de carne alimentado con piensos con diferentes perfiles en AG. Rigoni et al. (2001) han valorado la PC y el CR mediante la utilización de cámaras de respiración en circuito abierto, en gallos reproductores alimentados con piensos con 2% de aceite de soja (S), aceite de linaza (L) y aceite de pescado (O) respectivamente frente a un pienso control (C). Los resultados demostraron que a igual retención de energía, los animales alimentados con aceite de pescado producían más calor (O: 471 kJ/PV^{0.75} vs. C: 411 kJ/PV^{0.75}, $P \leq 0,01$) y menor CR (O: 0,89 vs. C: 0,95; $P \leq 0,05$), comparado con la dieta control, concluyendo que la mayor pérdida de energía era debida posiblemente a la mayor oxidación lipídica. Newman et. al. (2002) evaluaron el efecto de la inclusión del 8% de grasas saturadas (AGS) respecto al 8% de inclusión de grasas ricas en AGPI (n6 y n3) en el pienso de pollos broiler adultos. El menor CR fue registrado en las aves que consumieron AGPI (n3 = 0,89, n6 = 0,84 vs. SAT = 0,92; $P > 0,05$) aunque esta diferencia no llegó a ser significativa.

Por lo que se refiere a la ER, se puede determinar por diferencia sustrayendo la PC a la EMA ingerida o bien a través de la técnica de sacrificios comparados estimando la diferencia de energía que contiene el animal al empezar y al terminar la experiencia

(Kleiber, 1961).

La eficiencia de utilización de la EMA por el animal se define como la proporción de energía que es retenida o $\text{energía retenida} / \text{EMA ingerida}$. Es, por tanto, el complemento del IT, cuando este último se expresa como porcentaje de la EMA. La eficiencia con la cual se utiliza la EMA depende sobre todo la interacción entre la naturaleza de los compuestos químicos del alimento que proporcionan energía y la finalidad con la que el animal emplea estos compuestos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

2. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS

Está bien establecido que los ácidos grasos de la ración afectan a la composición de la grasa depositada en pollos de carne. Estudios previos han demostrado que, además de una modificación en el perfil de ácidos grasos, se produce un cambio en la cantidad de grasa depositada en el animal. En concreto, el consumo de raciones ricas en ácidos grasos poliinsaturados provoca una disminución de la grasa depositada respecto al consumo de raciones ricas en grasa saturada.

Esta disminución se ha observado, fundamentalmente en la grasa abdominal, existiendo evidencias de que se modifican otros depósitos de grasa separable. Sin embargo, en la revisión bibliográfica realizada no se han encontrado datos sobre la modificación de la cantidad de grasa de la piel (incluida la grasa subcutánea) a pesar de que es uno de los depósitos separables más importantes del pollo de carne. Tampoco se han encontrado trabajos diseñados para valorar la interacción entre nivel y tipo de grasa añadida a la dieta sobre el depósito de grasa de los pollos.

En la revisión bibliográfica de la presente Memoria de Tesis se ha seguido la ruta de los ácidos grasos ingeridos en la ración, y se han descrito algunos aspectos relevantes del metabolismo lipídico en las aves. Se ha puesto de manifiesto el efecto de algunos ácidos grasos sobre la expresión génica, la actividad de enzimas y otras moléculas, consideradas claves en el metabolismo lipídico. Sin embargo, a día de hoy, existen pocos trabajos diseñados para clarificar las razones metabólicas responsables de las diferencias en la cantidad de grasa depositada por el animal que se producen al consumir diferentes tipos de grasas.

Por último, se han revisado aspectos del metabolismo energético y como la energía de piensos ricos en grasa se distribuye en el animal entero, pasando por la descripción de métodos experimentales utilizados para determinar la producción de calor y la retención de energía en el animal. Además, se ha señalado la falta de estudios encaminados a evaluar si la eficiencia de utilización de la energía metabolizable para crecimiento en pollos de carne varía según el grado de insaturación de la grasa consumida.

Por todo lo anterior, la presente Tesis Doctoral se centra en estudiar el efecto del perfil de ácidos grasos de la ración sobre el depósito de grasa en el pollo de carne, con los

siguientes objetivos:

- Estudiar si el grado de insaturación de la ración afecta al depósito de grasa en la piel (incluida grasa subcutánea) y su relación con las modificaciones demostradas en la grasa abdominal (trabajo 1).
- Determinar si las modificaciones en el depósito de grasa provocadas por el tipo de grasa añadida al alimento se ven afectadas por el nivel de incorporación (trabajo 2).
- Establecer el papel de los diferentes ácidos grasos de la ración sobre la regulación de diferentes etapas del metabolismo lipídico, incluyendo la síntesis, la oxidación y el depósito de los lípidos consumidos (trabajo 3). Para ello se plantea determinar como diferentes grados de insaturación dietética afectan a:
 - el nivel de hidrólisis de los triglicéridos circulantes, previo a su entrada en los diferentes tejidos estudiados.
 - la actividad de enzimas de lipogénesis en hígado y de lipólisis en tejidos periféricos.
 - el nivel de hormonas tiroideas.
- Determinar si el tipo de grasa suplementada en el pienso puede modificar la producción de calor, es decir la eficiencia de utilización de la energía por parte del ave (trabajo 4 y 5). Para ello se plantea:
 - Establecer una relación entre el tipo de grasa de la ración, saturada o poliinsaturada, y la distribución de la energía en el pollo de carne, en base a la determinación de la energía retenida y la producción de calor a través de técnicas de sacrificios comparados y respirometría indirecta.

Para ello, se realizaron 5 pruebas con pollos de carne. Se utilizó un pienso base, bajo en grasa o sin grasa añadida como control negativo, al cual se añadió grasas que diferían en su composición, bien, sebo, como fuente de ácidos grasos saturados de cadena larga o aceite de linaza, rico en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3. En relación al estudio de la reducción de los depósitos de grasa en el animal, el nivel y el tipo de grasa añadida al pienso representaron los factores de variación del diseño. En relación a la valoración energética de la ración, el nivel de alimentación y el tipo de grasa suplementada fueron los principales factores de variación.

Desde el punto de vista práctico, estos estudios plantean el interés de una reevaluación

energética de las grasas, y pueden ayudar a elaborar estrategias alimentarias para reducir el engrasamiento, combatir el estrés por calor y mejorar la eficiencia energética de la ración de pollos de carne.

CAPÍTULO 3

Dietary Polyunsaturated Fat Reduces Skin Fat as well as Abdominal Fat in Broiler Chickens

G. Ferrini¹, M. D. Baucells¹, E. Esteve-Garcia², and A. C. Barroeta¹

¹ Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animals. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Edifici V 08193-Bellaterra, Barcelona. Spain.

² Nutrició Animal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

2008 Poultry Science 87: 528-535

3.1 Abstract

The aim of this study was to determine the effect of different dietary fatty acid profiles on the main fat depots of broiler chickens: skin including subcutaneous fat (SK) and abdominal fat pad (AF). One-hundred forty-four female broiler chickens were fed a low fat diet (B; 0.5 % of added fat) or diets supplemented with 10% of tallow (T), sunflower oil rich in oleic acid (SOO), sunflower oil rich in linoleic acid (SOL), linseed oil rich in linolenic acid (LO) or a mix of fats (M: 55 % of T + 35 % of LO + 10 % SOL) that contained one-third each of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and polyunsaturated fatty acids. The animals were housed in 36 cages and were randomly distributed into 6 dietary treatments with 6 replicates each. Experimental diets were evaluated for apparent total fatty acid availability and apparent metabolizable energy (AME). On d 42, birds were slaughtered in order to determine the weight of AF and SK and fatty acid profile. Regarding the diets containing 10% added fat, the highest saturated diet (T) resulted in the lowest values of apparent total fatty acid availability and percentage of AME. Animals fed the most polyunsaturated diet (LO) had a lower SK deposition than those fed saturated diet, on both an absolute (LO: 145 vs. T: 159 and M: 168 g; $P < 0.001$) and a relative basis (LO: 6.94 vs. T: 7.39 and M: 7.52 g/ 100 grams of body weight; $P < 0.001$). Furthermore, the lowest AF depot was observed in LO diet (LO: 26.3 g vs. T: 37.6 and M: 39.9 g; $P < 0.001$). The added fat treatments caused significant but similar changes in fatty acid profile of both studied tissues. In conclusion, feeding broiler chickens polyunsaturated fatty acids, in comparison to dietary saturated fatty acids, reduced the amount of both AF and SK by approximately 30 % and 9 %, respectively.

Key word: broiler, fatty acid profile, skin fat, abdominal fat pad

3.2 Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del perfil en ácidos grasos (FA) de la ración sobre los principales depósitos de grasa en el pollo de carne: piel (SK; incluyendo la grasa subcutánea) y grasa abdominal (AF). Ciento cuarenta y cuatro pollos hembras fueron alimentados con una dieta baja en grasa (B; 0,5 % de grasa añadida), o con raciones suplementadas con el 10 % de: sebo (T), aceite de girasol rico en ácido oleico (SOO), aceite de girasol rico en ácido linoleico (SOL), aceite de linaza rico en ácido linolénico (LO) o una mezcla de grasas (M: 55 % de T + 35 % de LO + 10 % SOL) que contenía la misma proporción en FA saturados, FA monoinsaturados, y FA poliinsaturados. Los animales fueron alojados en 36 jaulas y fueron distribuidos aleatoriamente en 6 tratamientos (6 aves para cada tratamiento). Se evaluó la digestibilidad del total de FA (TFA) y la energía metabolizable aparente (AME) de los piensos experimentales. El día 42, las aves fueron sacrificadas determinándose el peso de la AF y la SK así como su perfil en FA. En cuanto a las raciones que contenían el 10% de grasa añadida, la más saturada (T) dio lugar a los valores más bajos de digestibilidad de TFA y de porcentaje de AME. Los animales alimentados con la ración más poliinsaturada, comparado con los alimentados con un pienso más saturado, registraron un menor depósito de SK tanto en valores absolutos (LO: 145 vs. T: 159 y M: 168 g, $P < 0,001$) como relativos (LO: 6,94 vs. T: 7,39 y M: 7,52 g / 100 g de peso vivo; $P < 0,001$). Además, el menor depósito de AF se observó en el tratamiento LO (LO: 26,3 g vs T: 37,6 y M: 39,9 g, $P < 0,001$). Los tratamientos con alto contenido en grasa dieron lugar a importantes modificaciones en el perfil en ácidos grasos de los tejidos estudiados, reflejando perfiles en FA similares a los piensos consumidos. En conclusión, el consumo de piensos ricos en FA poliinsaturados, en comparación con el consumo de piensos ricos en FA saturados, da lugar a una reducción de la cantidad de AF y SK de aproximadamente el 30 % y el 9 %, respectivamente.

Parablas clave: pollos de carne, perfil de ácidos grasos, piel, grasa abdominal

3.3. Introduction

Many studies have showed that the growth pattern of fat depots can be modified by dietary means. For example, Sanz et al. (1999), Crespo and Esteve-Garcia (2001) and Villaverde et al. (2006) suggested that the reduction of lipid content of broiler chickens was strongly related to the dietary fatty acid (FA) profile. These authors reported less body fat and abdominal fat pad (AF) accumulation in broiler chickens fed diets containing high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) compared to chickens fed diets containing high levels of saturated fatty acids (SFA) or monounsaturated fatty acids (MUFA). The reduction of total body fat and abdominal fat in chickens fed PUFA was accompanied by a reduction in other separable fat depots. Moreover, different growth patterns were observed for the different fats depots such as mesenteric fat and neck fat (Crespo and Esteve-Garcia, 2002). Skin fat, including subcutaneous fat (SK), represents approximately 11-15 % of the carcass weight of chickens (Fereidoun et al., 2007) and, with AF, represents the main separable fat depots of the birds. However, few studies on the effect of dietary fats on the pattern of broiler SK deposition have been published. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of different dietary fatty acids on the weight and fatty acid profiles of the skin, including subcutaneous fat, compared to the changes in the abdominal fat pad.

3.4. Material and Methods

3.4.1. Experiment design

The animal facilities, working protocol, and slaughtering process were approved by the UAB (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) Ethical Committee. One-hundred forty-four 1-d-old female broiler chickens of Ross 308 strain were obtained from a commercial hatchery (Terra-Avant S.A., Girona, Spain). The chicks were randomly separated into six groups and each group was fed one of six diets. Throughout the study, feed and water were provided for ad libitum consumption. On 8 d of age, birds were weighed ($135 \pm 1.55\text{g}$) and placed in 36 cages (4 birds per cage) until d 42. There were six replicates of 4 birds per treatment. The diets were formulated according to NRC requirements (1994) and were similar to those of Crespo and Esteve-Garcia (2002). The six diets were based on wheat and soybean meal (Table 3.1).

TABLE 3.1. Ingredients and nutrient composition of experimental diets¹

Ingredient (%)	Treatment ²					
	B	T	SOO	SOL	LO	M
Wheat	68.8	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3
Soybean meal (48%)	26.6	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1
Tallow	-	10.0	-	-	-	5.5
Sunflower oil rich in oleic	-	-	10.0	-	-	-
Sunflower oil rich in linoleic	0.5	-	-	10.00	-	1.0
Linseed oil	-	-	-	-	10.0	3.5
DL-Methionine (99%)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
L-Threonine	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L-Lysine	0.23	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Calcium Carbonate	1.65	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Dicalcium phosphate	1.14	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Salt	0.40	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Vitamin and mineral premix ³	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
<i>Nutrient composition analyzed (%)</i>						
Dry matter	90.1	90.9	90.9	90.9	90.9	91.3
Ash	5.1	5.3	5.0	5.1	5.3	5.0
Crude protein	21.2	20.9	21.4	20.7	21.7	20.7
Ether extract	1.9	10.4	11.1	13.3	12.6	13.1
Crude fiber	4.1	4.5	4.2	4.1	4.3	4.4
<i>Nutrient composition calculated (%)</i>						
L-Lysine	1.05	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
DL-Methionine	0.53	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54
Methionine+Cys	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
L-Threonine	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
Ca ²⁺	0.99	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Available P	0.17	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
Na ⁺	0.17	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Gross energy (kcal/kg of feed) [†]	4,394	4,761	4,833	4,810	4,832	4,887
AME (kcal/kg of feed) [‡]	2,826	3,300	3,300	3,300	3,300	3,300
AME (kcal/kg of feed) [†]	3,257	3,301	3,716	3,700	3,663	3,655

¹Values are means of 3 determinations of samples taken on days 8, 22, 42 of the experiment.

²B: diet low in fat; T = diet with 10% of added tallow; SOO= diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL= diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO = diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M = diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL). ³ Provided per kg of diet: vitamin A: 12,000 IU; vitamin D3: 2,400 IU; vitamin E: 30 mg; vitamin K₃: 3 mg; vitamin B₁: 2.2 mg; vitamin B₂: 8 mg; vitamin B₆: 5 mg; vitamin B₁₂: 11 µg; folic acid: 1.5 mg; biotin: 150 µg; calcium pantothenate: 25 mg; nicotinic acid: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Ethoxyquin: 150 mg.

[†]Analyzed [‡] Calculated

Five of the diets were supplemented with 10% of different types of fat (provided by Cailá-Parés S.A., E-08040 Barcelona, Spain): tallow (T), sunflower oil rich in oleic acid (SOO), sunflower oil rich in linoleic acid (SOL), linseed oil rich in linolenic acid (LO) or a mix of fats (M: 55 % of T + 35 % of LO + 10 % SOL). The M diet was formulated to have a similar percentage in the main classes of fatty acids (33 % SFA + 33 % MUFA + 33 % PUFA). A sixth diet was supplemented with a low level of fat (0.5 %

sunflower oil rich in linoleic acid) and, consequently, it had low energy content (B). Food consumption and chicken weight were recorded at 8, 22 and 42 d of age. Feed samples taken on days 8, 22 and 42 were frozen at -20 °C for analysis. A digestibility balance study was performed in order to calculate the percentage of AME and apparent total FA availability. Between 29 and 31 d of age, total excreta were collected from each replicate group for 48 h. The excreta were weighted, homogenized (Robot Coupe®, model Blixer 3B., France), and a representative sample (10 % of total excreta) was frozen at -20 °C, lyophilized (Kinetic Thermal System: condenser Dura-Dry™. Model FD2055D0T000. U.S.), and stored at -20 °C until subsequent analyses were performed. Apparent digestibility values were calculated as the difference between intake and excretion, and expressed as percentage of intake.

The 42-d-old broiler chickens were stunned, slaughtered, bled, plucked, and chilled at 4 °C for 24 h in a local slaughterhouse. The carcasses (total body weight excluding blood and feathers) were weighed and the AF (from the proventriculus surrounding the gizzard down to the cloaca), and SK were removed and also weighed. Total body lipid was estimated using linear regression analysis according to Crespo and Esteve-Garcia (2002). The percentages of SK and AF were expressed as percentage of final body weight. One representative sample of each tissue (n =6 samples per treatment) was freeze-dried, ground, and frozen at -20 °C for the analysis of fatty acids.

3.4.2. Analytical determinations

Chemical composition of feed and excreta were determined according to the following methods of the AOAC International (2000): dry matter content (934.01), ash content (942.05), crude protein (984.13), ether extract (920.39), and crude fiber (962.09). Gross energy was determined by the means of an adiabatic bomb calorimeter (IKA-Kalorimeter system C4000, Jankel-Kunkel, Staufen, Germany). Ingredient and nutrient composition of experimental diets are shown in Table 3.1.

3.4.3. Fatty acid analysis

The FA content of experimental diets (Table 3.2) and excreta samples were determined according to the method of Surkhija and Palmquist (1988). The FA of SK and AF were determined by Carrapiso et al. (2000).

TABLE 3.2. Fatty acid composition (%) of experimental diets ¹

Fatty acid	Treatment ²					
	B	T	SOO	SOL	LO	M
C 14:0	0.21	2.86	0.07	0.11	0.08	1.58
C 14:1 $\omega 5$	0.00	0.48	0.00	0.00	0.00	0.26
C 15:0	0.12	0.98	0.00	0.04	0.02	0.56
C 16:0	17.1	24.7	5.77	8.54	7.18	16.5
C 16:1 $\omega 7t$	0.00	0.24	0.00	0.03	0.02	0.14
C 16:1 $\omega 7$	0.16	2.28	0.10	0.13	0.04	1.29
C 16:2 $\omega 4$	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.19
C 17:0	0.18	1.76	0.00	0.07	0.04	0.99
C 17:1 $\omega 7$	0.00	0.46	0.00	0.04	0.02	0.27
C 18:0	2.59	19.8	13.5	3.81	3.27	12.20
C 18:1 $\omega 9^3$	16.5	32.1	70.3	28.1	16.7	26.3
C 18:1 $\omega 7$	1.02	1.35	0.68	0.78	0.71	1.12
C 18:2 $\omega 6$	57.5	10.5	17.9	59.8	22.1	19.5
C 18:3 $\omega 3$	4.19	1.32	16.1	0.88	49.6	18.5
C 18:4 $\omega 3$	0.00	0.35	0.00	0.00	0.04	0.18
C 20:0	0.49	0.20	0.28	0.20	0.10	0.19
C 20:1 $\omega 9$	0.00	0.05	0.31	0.00	0.00	0.06
C 24:1 $\omega 9$	0.00	0.00	9.67	0.25	0.06	0.09
SFA ⁴	20.7	50.3	9.70	12.4	10.7	32.0
MUFA	17.6	36.9	71.4	28.5	17.5	29.6
PUFA	61.7	12.8	18.9	59.1	71.8	38.4
PUFA:SFA rate	2.99	0.25	1.96	4.75	6.72	1.20

¹ Values are means of 3 determinations of samples taken on days 8, 22 and 42 of experiment.

²B: diet low in fat; T = diet with 10% of added tallow; SOO= diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL= diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO = diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M = diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL).

³C18:1 $\omega 9$ includes sum of *cis* and *trans* isomers. ⁴SFA = saturated fatty acids; MUFA= monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

In both cases, the FA techniques used in this study consist of a direct transesterification: lipid extraction and FA methylation is achieved in only one step. Samples were incubated at 70°C with methanolic chloride and the organic layer was extracted with toluene. Nonadecanoic acid (C19, Sigma-aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) was added at the beginning of the procedure as an internal standard. The heptane extracts were injected in a Gas-Chromatograph (HP6890, Agilent, Waldbronn, Germany) following the method conditions were previously described by Cortinas et al. (2004). Peak areas were integrated and converted to concentration with comparison with the internal standard peak area. Concentration FA_x = (Area FA_x /Area C19) × (μg C19 / (RC × simple weight), where RC is the response coefficient. Identification of fatty acids was made by comparison between retention times of the simple peaks with the retention time of the standards (Supelco® 37 component FAME Mix. Sigma-Aldrich

Biotechnology LP and Sigma-Aldrich Co). The sum of total FA of each sample was used as an estimator of the total amount of fat (g of fat per kg of analyzed tissue) according to Villaverde et al. (2005).

3.4.4. Statistical Analysis

All values were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure of SAS for Windows version 9.1 (SAS Inst., Inc., Cary, NC). When the F test for treatments was significant at $P \leq 0.05$ in the ANOVA table, means were compared for significant differences using the Tukey test of SAS. The cage (4 animals) was the experimental unit for performance parameters and digestibility balance. For final body, carcass, and tissue weight the chicken was the experimental unit (24 determinations/diet), while for the fatty acid content analysis it was the individual (6 determinations/diet). The relationship of skin and abdominal fat depot per treatments was assessed by linear regression analysis using the Proc REG of the same statistical package. The treatments not significantly correlated were not included in the prediction equation.

3.5. Results and Discussion

3.5.1. Bird performance

The feed to gain ratio (F:G) of chickens fed negative diet control (B) was the highest in relation to the rest of the treatments (B: 1.97; $P < 0.001$) due to the lower weight gain recorded (Table 3.3; 8-42 d: 40.1 g; $P < 0.001$). Of all the treatments with 10 % of added fat, the T diet resulted in the poorest F:G value due to the higher feed intake of these chickens which was in agreement with the results of Crespo and Esteve-Garcia (2001) and Villaverde et al. (2004). Sanz et al. (1999) did not observe performance differences in chickens fed with different types of dietary added fat.

During the experimental period (from 8 to 42 d of age), the AME intake of chickens fed negative control diet (B) was lower than energy intake of chickens fed the treatments with 10 % of added fat (317 vs. 367 kcal AME intake/animal/d, respectively; $P < 0.01$). This result paralleled to the lower performance parameter found in group B. The lowest percentage of AME was recorded in the saturated rich diet (T) in accordance with the low values of total FA and, in particular, SFA availability observed (Table 3.4). The

more unsaturated diets (SOO, SOL and LO) presented higher mean values of total FA and SFA digestibility than the other treatments. These results agree with the established higher percentage of AME and fat availability of unsaturated oils in comparison to saturated fats reported by Blanch et al. (1995) and Wiseman and Salvador (1991). Compared with T, an improvement in the SFA availability of group M was observed. It has been established that the nutritive value of a SFA, defined in terms of the quantity of fat absorbed, increases in the presence of unsaturated fatty acids. In this synergism between FA, the PUFA improves the micellar solubilization and subsequent absorption of the SFA (Renner and Hill, 1961).

TABLE 3.3. Effect of dietary fat type on broiler performance from 8 to 42 d of age¹

Treatment ³	Weight gain (g/d)	Feed intake (g/d)	Feed: gain ratio
B	40.1 ^d	98.2 ^b	1.97 ^a
T	59.9 ^{ab}	113 ^a	1.87 ^b
SOO	56.8 ^c	97.6 ^b	1.74 ^c
SOL	57.5 ^{bc}	98.1 ^b	1.71 ^c
LO	57.5 ^{bc}	97.0 ^b	1.69 ^c
M	61.4 ^a	106 ^b	1.72 ^c
Root MSE ⁴	2.19	5.71	0.074

^{a-c} Means within a column without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). ¹Values are means of 6 replicates of 4 chickens/diet. ²B: diet low in fat; T = diet with 10% of added tallow; SOO = diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL = diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO = diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M = diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL). ⁴MSE = Pooled standard deviation.

TABLE 3.4. Effect of dietary fat type on broiler energy and fatty acid (FA) digestibility balance from 29 to 31 d of age¹

Treatment ²	Apparent Digestibility (%)				
	AME ³	Total FA	SFA	MUFA	PUFA
B	70.9 ^b	61.5 ^c	52.6 ^c	58.1 ^d	65.4 ^c
T	66.4 ^c	62.2 ^c	47.1 ^c	82.7 ^c	62.2 ^c
SOO	73.2 ^a	88.4 ^a	76.1 ^a	93.0 ^a	77.0 ^b
SOL	73.8 ^a	88.5 ^a	80.5 ^a	90.6 ^{ab}	89.2 ^a
LO	72.8 ^{ab}	88.1 ^a	72.5 ^a	87.7 ^b	89.9 ^a
M	72.0 ^{ab}	81.5 ^b	68.5 ^b	89.0 ^b	86.6 ^a
Root MSE ⁴	1.88	2.43	4.17	2.18	2.31

^{a-c} Means within a column without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). ¹Values are means of 6 replicates of 4 chickens/diet. ²B: diet low in fat; T = diet with 10% of added tallow; SOO = diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL = diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO = diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M = diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL). ³AME = apparent metabolizable energy; SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids. ⁴MSE = Pooled standard deviation.

3.5.2. Skin and abdominal fat depots

Chickens fed B had lower body weight than those fed diets with 10 % of added fat at 42 days of age (1828 g, $P < 0.001$; Table 3.5). On the other hand, the body weight was higher in chickens fed M compared to the birds fed SOL and LO polyunsaturated diets. The carcass weight paralleled the body weights in all treatments, while carcass percentages were not affected by dietary treatment.

The AF and SK weight were lower in chickens fed B diet compared to chickens fed supplemental fat diets (Table 3.5). Regarding the diets containing 10% added fat, broiler chickens fed dietary PUFA showed lower AF and SK weights than those chickens fed dietary SFA on both an absolute and a relative basis. The differences in AF depot in SOO, SOL or LO chickens accounted for -4.78 ± 3.1 g, -10.1 ± 2.9 g and -11.0 ± 3.1 g, respectively, compared to those fed the T diet. The amount of total body fat estimated (Crespo and Esteve-Garcia, 2002a) from AF values was 273 ± 10.4 g for T, 246 ± 10.6 g for SOO, 228 ± 10.6 g for SOL, and 228 ± 10.2 g for LO. Thus, differences in AF depot represented approximately 19, 23 and 25 % of the total reduction of body fat. The results are in agreement with Sanz et al. (2000), Crespo and Esteve-Garcia (2001) who have reported that abdominal fat pad decreases in birds fed diets rich in PUFA. In addition, the present results showed that dietary PUFA also lowered ($P < 0.001$) SK. The differences in SK depot of SOL and LO chickens accounted for -9.2 ± 7.1 g and -12.7 ± 6.0 g respectively, compared to those fed T (Table 3.5). These differences in SK depot represented approximately 21 and 29 % of the total reduction of body fat, and were slightly greater compared to the weight reductions found in AF. No differences in SK weight of SOO chickens compared to T were found. These results show that the main fat deposit of broiler chickens responded to the dietary FA profile, and that SK represented approximately 60% of total body fat of broiler chickens, compared to 12 % for the AF. Few studies have assessed the effect of dietary fats on SK of broiler chickens. Selverej and Purushothaman (2004) found that the skin weight decreases when the dietary level of sunflower seed rich in $\omega 6$ fatty acids is increased.

The following linear regression equation was calculated for all treatments relating to abdominal fat weight (AFW) and skin weight (SKW), in grams: $SKW = 97.4 \pm 5.18 + 1.67 \pm 0.18 \times AFW$; ($r^2 = 0.50$; $P < 0.0001$). This result is in agreement with Zerehdaran

et al. (2004), who found that abdominal fat weight had a high coefficient of determination with respect to the skin weight ($r^2 = 0.54$).

TABLE 3.5. Final body weights and carcass, abdominal fat, and skin contents of broiler chickens fed various dietary fat types¹

Item ²	Final body weight (g)	Carcass ³ weight (g)	Carcass percentage (%)	Abdominal fat		Skin	
				(g)	(%)	(g)	(%)
B	1828 ^c	1627 ^c	88.9	15.9 ^d	0.87 ^c	111 ^d	6.07 ^c
T	2153 ^{ab}	1924 ^{ab}	89.1	37.6 ^a	1.75 ^a	159 ^{ab}	7.39 ^a
SOO	2158 ^{ab}	1927 ^a	88.3	32.0 ^b	1.47 ^b	164 ^a	7.45 ^a
SOL	2069 ^b	1838 ^b	88.9	26.7 ^{bc}	1.29 ^b	151 ^{bc}	7.34 ^a
LO	2097 ^b	1865 ^b	89.0	26.3 ^c	1.24 ^b	145 ^c	6.94 ^b
M	2235 ^a	2001 ^a	89.5	40.0 ^a	1.79 ^a	168 ^a	7.52 ^a
Root MSE ⁴	153.4	141.4	0.97	9.28	0.418	21.2	0.726

^{a-d} Means within a column without a common superscript differ significantly ($P < 0.05$).¹ Values are means of 24 birds/diets. ² B: diet low in fat; T = diet with 10% of added tallow; SOO= diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL= diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO = diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M = diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL). ³ Carcass weight= total body weight excluding blood and feather; ⁴ MSE=Pooled standard deviation.

The observed reduction of fat deposition resulting from the dietary PUFA (LO) in contrast to saturated treatment (T) was not explained on the basis of lower ($P < 0.05$) apparent total FA availability (LO: 88.1 vs. T: 62.2%; Table 3.4), and AME intakes during the experimental period (LO and T: 367 kcal/animal/d). Thus, these changes in fat deposition most likely resulted from changes in lipid metabolism. Different rates of lipid synthesis or lipid oxidation according to the dietary fatty acid profile have been reported by different authors (Sanz et al. 2000b, Crespo and Esteve-Garcia 2002c; Ferrini et al. 2005), who suggested that preferential oxidation of PUFA compared to SFA or MUFA could reduce FA available for deposition. Moreover, balance between energy intake and energy expenditure is known to play a fundamental role in accumulating energy storage as fat. In this sense, different studies have shown that heat loss may be greater when a fat-rich diet is consumed, with PUFA contained playing a crucial role (Clark 2000; Newman et al. 2002; Ferrini et al. 2007).

3.5.3. Fatty acid composition

Total FA content of SK was between 67% and 76% of tissue weight and did not differ ($P > 0.05$) among treatments (Table 3.6). Chickens fed M had higher ($P < 0.05$) FA content in AF compared to B and LO (M: 83 % vs. B: 73 % and LO: 77 %. Table 3.7). The added fat treatments caused significant but similar changes in FA profile of both tissues. At the same time, the proportion of FA classes found in the tissues paralleled the proportion of FA classes of the fat added to the diets. In contrast, a large portion of SFA and MUFA deposited in chickens fed diet B were derived mainly from *de novo* synthesis of fatty acid due to the lower FA content in the diet (B: 1.9% vs. between 10.4 % and 13.3 % of EE; Table 1). The SK and AF SFA content was higher in T and M compared to the rest of treatments, and it was likely due to the higher concentration of palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0), derived mainly from the diet. The highest content of MUFA was in SOO chicken tissues, which was likely due to the high amount of oleic acid (C18:1 ω 9), from the diet. PUFA, which are exclusively of exogenous origin, were higher in the tissues of chickens fed SOL and LO diet compared to the rest of treatments. Furthermore, the main tissue PUFA were linoleic acid (C18:2 ω 6), and linolenic acid (C18:3 ω 3). The highest PUFA:SFA ratio was in the LO diet, with a similar ratio in the SK including subcutaneous fat (LO: 3.77 and SOL: 2.64 vs. M: 1.10, SOO: 0.93 and T: 0.27; $P < 0.001$) and AF (LO: 3.93 and SOL: 2.54 vs. M: 1.06, SOO: 0.92 and T: 0.26; $P < 0.001$), in agreement with the data previously reported by Blanch et al. (2000). The changes of profile of FA of SK caused by different dietary types of added fat could represent an important factor to investigate, since they could be related to the breaking strength. Christensen et al. (1994) found that the breaking strength of skin was not consistently associated with the different levels of dietary fat.

3.6. Conclusion

In conclusion, the results of this study suggest that SK and AF weights in broiler chickens can be attenuated by dietary FA, and that fats rich in PUFA, as compared to SFA, produce smaller fat depots. However, this effect is greater in AF than in SK.

TABLE 3.6. Effect of dietary fatty acid on the fatty acid content of skin fat including subcutaneous fat¹

Fatty acid	Treatment ²						Root MSE ³	P value
	B	T	SOO	SOL	LO	M		
C 8:0	0.09	0.10	0.09	0.10	0.08	0.08	0.001	NS
C10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.009	***
C 14:0	3.90 ^c	18.2 ^a	1.84 ^d	2.11 ^{cd}	1.80 ^d	9.61 ^b	1.295	***
C 14:1 ω 5	1.46 ^{cd}	4.57 ^a	0.33 ^c	0.28 ^c	0.26 ^c	1.03 ^{bc}	0.569	***
C 15:0	0.74 ^{cd}	5.22 ^a	0.54 ^{cd}	0.85 ^c	0.42 ^d	1.99 ^b	0.720	***
C 16:0	166 ^a	161 ^a	73.2 ^{cd}	87.6 ^c	71.5 ^d	125 ^b	13.17	***
C 16:1 ω 7t	3.85	5.54	4.50	3.64	2.32	4.07	1.395	NS
C 16:1 ω 7	49.1 ^a	41.8 ^b	12.6 ^d	9.81 ^d	9.77 ^d	24.1 ^c	4.599	***
C 16:2 ω 4	0.90 ^b	0.35 ^c	0.66 ^{bc}	2.80 ^a	0.99 ^b	0.75 ^b	0.261	***
C 17:0	0.56 ^c	4.18 ^a	0.46 ^c	0.40 ^c	0.23 ^c	2.24 ^b	0.232	***
C 17:1 ω 7	1.20 ^c	9.78 ^a	1.22 ^c	1.78 ^c	1.33 ^c	6.25 ^b	0.451	***
C 18:0	40.8 ^c	61.7 ^a	29.9 ^e	36.2 ^{cd}	33.7 ^{de}	53.9 ^b	4.19	***
C 18:1 ω 9t	0.00	1.94	0.00	0.00	0.00	3.24	1.719	NS
C 18:1 ω 9	278 ^c	361 ^b	489 ^a	223 ^d	152 ^e	251 ^{cd}	25.8	***
C 18:1 ω 7	20.4 ^a	17.9 ^a	7.78 ^b	5.52 ^b	5.65 ^b	8.09 ^b	2.266	***
C 18:2 ω 6	88.5 ^c	52.8 ^d	91.9 ^c	327 ^a	125 ^b	107 ^{bc}	14.14	***
C 18:3 ω 6	1.02 ^b	0.53 ^c	0.91 ^b	1.90 ^a	0.58 ^c	0.48 ^c	0.252	***
C 18:3 ω 3	5.42 ^c	7.35 ^c	5.54 ^c	4.43 ^c	279 ^a	100 ^b	12.22	***
C 18:4 ω 3	0.07 ^d	4.86 ^a	0.00	0.00	1.67 ^b	1.09 ^c	0.310	***
C 20:0	3.10 ^a	2.79 ^a	3.41 ^{ab}	1.61 ^b	1.20 ^c	1.69 ^b	0.224	***
C 20:1 ω 9	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.014	***
C 20:2 ω 6	0.65 ^b	0.41 ^c	0.44 ^c	1.15 ^a	0.50 ^c	0.54 ^{bc}	0.107	***
C 20:3 ω 6	2.35	1.05	2.09	1.46	1.71	0.79	1.236	NS
C 21:0	0.00	0.00	0.00	0.00	1.45 ^a	0.19 ^b	0.475	***
C 20:4 ω 6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.59 ^a	0.27 ^b	0.112	***
C 20:5 ω 3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.18 ^a	1.79 ^b	0.426	***
C 22:6 ω 3	0.00	0.00	0.00	0.95 ^b	1.90 ^a	2.06 ^a	0.672	***
C 24:1 ω 9	0.55 ^b	0.11 ^b	0.37 ^b	0.89 ^{ab}	1.62 ^a	0.65 ^b	0.597	**
Total FA ⁴	668	764	728	714	699	708	62.1	NS
SFA	215 ^b	253 ^a	109 ^c	129 ^c	110 ^c	195 ^b	18.3	***
MUFA	355 ^c	443 ^b	516 ^a	245 ^d	173 ^e	299 ^{cd}	30.9	***
PUFA	98.9 ^d	67.4 ^d	102 ^d	340 ^b	416 ^a	214 ^c	22.0	***
PUFA:SFA	0.46 ^d	0.27 ^d	0.93 ^c	2.64 ^b	3.77 ^a	1.10 ^c	0.175	***

^{a-c} Value in the same row with no common superscripts are significantly different. ¹Values are means of 6 determinations/diet expressed as g/kg of tissue. ²B: diet low in fat; T=diet with 10% of added tallow; SOO=diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL=diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO=diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M=diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL). ³MSE=Pooled standard deviation. ⁴FA= fatty acids; SFA=saturated fatty acids; MUFA=monounsaturated fatty acids; PUFA=polyunsaturated fatty acids. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

TABLE 3.7. Effect of dietary fatty acid on the fatty acid content of abdominal fat pad¹

Fatty acid	Treatment ²						Root MSE ³	P value
	B	T	SOO	SOL	LO	M		
C 8:0	0.45 ^a	0.44 ^{ab}	0.29 ^c	0.38 ^{bc}	0.32 ^c	0.42 ^{ab}	0.068	**
C10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.035	NS
C 14:0	4.41 ^c	18.1 ^a	1.89 ^d	2.33 ^d	1.78 ^d	11.4 ^b	0.791	***
C 14:1 ω 5	1.60 ^c	4.72 ^a	0.34 ^d	0.34 ^d	0.15 ^d	2.46 ^b	0.297	***
C 15:0	0.78 ^{cd}	6.04 ^a	0.57 ^d	1.03 ^c	0.69 ^{cd}	3.81 ^b	0.271	***
C 16:0	183 ^a	162 ^b	80.2 ^d	104 ^c	74.1 ^d	146 ^b	12.6	***
C 16:1 ω 7t	3.88 ^b	5.79 ^a	6.71 ^a	3.93 ^b	2.41 ^c	4.74 ^b	0.701	***
C 16:1 ω 7	53.7 ^a	42.7 ^b	14.6 ^d	12.5 ^d	9.5 ^d	28.5 ^c	4.36	***
C 16:2 ω 4	1.13 ^b	0.99 ^b	0.82 ^b	3.37 ^a	1.16 ^b	1.19 ^b	0.456	***
C 17:0	0.98 ^c	9.60 ^a	1.15 ^c	1.93 ^c	1.19 ^c	7.35 ^b	0.783	***
C 17:1 ω 7	0.37 ^c	4.42 ^a	0.43 ^c	0.36 ^c	0.40 ^c	2.72 ^b	0.269	***
C 18:0	46.6 ^b	60.8 ^a	31.5 ^d	41.3 ^{bc}	36.5 ^{cd}	63.5 ^a	6.01	***
C 18:1 ω 9	306 ^c	378 ^b	552 ^a	260 ^d	164 ^c	300 ^c	20.8	***
C 18:1 ω 7	22.4 ^a	18.2 ^b	8.64 ^d	7.59 ^d	5.84 ^c	11.9 ^c	1.116	***
C 18:2 ω 6	95.9 ^c	53.5 ^d	98.9 ^c	366 ^a	138 ^b	126 ^b	12.99	***
C 18:3 ω 6	1.17 ^b	0.00	1.07 ^b	2.31 ^a	0.00	0.14 ^c	0.347	***
C 18:3 ω 3	4.89 ^c	7.15 ^c	4.25 ^c	4.11 ^c	319 ^a	118 ^b	7.923	***
C 18:4 ω 3	0.00	4.90 ^a	0.00	0.00	1.87 ^b	1.26 ^c	0.343	***
C 20:0	3.70 ^a	2.92 ^b	3.87 ^a	1.94 ^c	1.41 ^d	2.02 ^c	0.354	***
C 20:2 ω 6	1.40 ^{ab}	0.00	1.86 ^a	1.15 ^{bc}	0.67 ^c	0.72 ^c	0.410	***
C 20:3 ω 6	0.00	0.00	0.00	4.79 ^a	0.00	0.00	0.576	***
C 21:0	0.00	0.00	0.00	0.00	2.61 ^a	0.55 ^b	0.218	***
C 20:4 ω 6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00	0.124	NS
C 20:5 ω 3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.16 ^a	1.44 ^b	0.575	***
C 22:6 ω 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.199	NS
C 24:1 ω 9	0.00	0.00	0.00	1.39 ^b	2.34 ^a	1.34 ^b	0.458	***
Total FA ⁴	734 ^c	780 ^{abc}	806 ^{ab}	821 ^{ab}	769 ^{bc}	835 ^a	46.3	*
SFA	239 ^b	260 ^a	116 ^d	152 ^c	118 ^d	235 ^b	18.3	***
MUFA	388 ^c	454 ^b	583 ^a	286 ^e	184 ^f	352 ^d	23.3	***
PUFA	104 ^d	66.6 ^c	107 ^d	382 ^b	466 ^a	248 ^c	18.6	***
PUFA:SFA	0.44 ^d	0.26 ^d	0.92 ^c	2.54 ^b	3.93 ^a	1.06 ^c	0.185	***

^{a-f} Value in the same row with no common superscripts are significantly different. ¹Values are means of 6 determinations/diet expressed as g/kg of tissue. ² B: diet low in fat; T = diet with 10% of added tallow; SOO= diet with 10% of sunflower oil rich in oleic acid; SOL= diet with 10% of sunflower oil rich in linoleic acid; LO = diet with 10% of added linseed oil rich in linolenic acid; M = diet with 10% of mix of fats (55% of T + 35% of LO + 10% of SOL). ³MSE = Pooled standard deviation. ⁴FA = fatty acids; SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

CAPITULO 4

Efecto de Distintas Fuentes de Ácidos Grasos de la Ración Sobre la Retención de Energía y Grasa en Pollos de Carne

G. Ferrini, E.G. Manzanilla, M. D. Baucells, A. C. Barroeta y J. Gasa

¹Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animals. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Edifici V 08193-Bellaterra, Barcelona. Spain

4.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la fuente y nivel de grasa de la ración sobre la retención de energía y grasa en pollos de carne. 48 pollos broiler hembras fueron distribuidos en 6 tratamientos que diferían en el nivel: 3, 6 y 9 % y tipo de grasa añadida: sebo (S) y linaza (L). Entre 1445 ±11 y 2596 ±218 g de peso vivo, se realizó un balance con recogida total de la excreta y sacrificio inicial y final. Los resultados demuestran que conforme aumentamos el nivel de inclusión de grasa aumenta la cantidad ER depositada en el animal entero. Por el contrario, la retención de nitrógeno disminuye conforme aumenta el nivel de inclusión, independientemente del tipo de grasa añadida a la ración. Los animales que consumieron la dieta L, presentaron la menor ER (S: 1009 vs. L: 906 kJ/100 g de ganancia de peso vivo; $P = 0.006$), en paralelo, con el menor depósito de grasa corporal (S: 11.2 g vs. L: 8.99 g/100 g de ganancia de peso vivo; $P = 0.010$). En este sentido, la eficiencia de retención de grasa en el animal es menor si la grasa que incorporamos a la ración es poliinsaturada en comparación con grasa saturada (S: 1.05 vs. L: 0.73 g grasa retenida/g grasa absorbida), independientemente de su nivel de inclusión. Estos resultados indican que los pollos que consumieron las dietas altamente poliinsaturadas depositaron menos energía y esta disminución fue a causa de una menor retención de grasa, en concreto de los ácidos grasos poliinsaturados.

Palabras clave: grasa añadida a la ración, balance, pollos de carne

4.2. Abstract

One experiment was conducted in broiler chickens to determine whether dietary fat source and dietary fat level modify the energy and body fat retention. Forty eight 1-d-old female broiler chickens were fed 6 diets differing in level of added fat (3, 6 and 9 % of added fat), and type (tallow (S) and linseed (L)). Between 1445 ± 11 and 2.596 ± 218 g of body weight, a comparative slaughter method was followed. The results show that when the level of dietary fat increases the whole animal retained energy (RE) increases. On another hand, retained nitrogen decreases when the level of inclusion increases independently of the source of dietary added fat. Between fats, birds fed L had lower RE (S: 1009 vs. L: 906 g kJ/100 g of gain weight, $P=0.006$) and lower body fat (S: 11.2 g vs. L: 8.99 g/100 g of body weight gain, $P=0.01$) than those fed S. In addition, the retention efficiency of body fat was lower when the polyunsaturated fat was added compared to the saturated added fat (S: 1.05 vs. L: 0.73 g retained fat / g of absorbed fat) regardless of the level of inclusion. These results suggest that chickens fed diets with higher level of polyunsaturation retain lower energy and this decline is due to the lower retained fat, specifically due to the polyunsaturated fatty acids.

Key words: dietary added fat, balance, broiler chickens

4.3. Introducción

Está bien establecido que la inclusión de grasa en la dieta de las aves mejora la proporción y utilización de la energía metabolizable de la ración (Jensen et al. 1970). Este efecto “extra-calórico” se explica por un menor incremento térmico y una mayor utilización de otros nutrientes. Por otro lado, entre los tipos de grasa, se sabe que la energía metabolizable de las grasas aumenta con el grado de insaturación (Blanch et al. 1995). Por lo tanto, parece lógica la hipótesis de que, el estado de engrasamiento del animal aumentará de forma paralela a la inclusión de grasa en la dieta, sobre todo si esta es poliinsaturada. Sin embargo, en la bibliografía encontramos diferentes trabajos que incorporan niveles crecientes de grasa en la ración de las aves y sus resultados son controvertidos. La inclusión de niveles crecientes de fuentes con un mayor grado de poliinsaturación (semillas de linaza y de aceite de soja y colza) reduce el contenido lipídico de las aves (Keren-Zvi et al. 1990; Ajuyah et al. 1991), mientras que la inclusión de niveles crecientes de grasa animal más saturada provoca un aumento de la cantidad de grasa abdominal y del engrasamiento corporal de las aves (Deaton et al. 1981). Sin embargo, la suplementación con fuentes grasas con niveles intermedios de poliinsaturación no parece afectar significativamente el estado de engrasamiento (Ajuyah et al. 1991; Donaldson 1995; Griffiths et al. 1997). En este contexto, es importante señalar que algunos estudios determinan experimentalmente la energía metabolizable real mientras que otros indican la energía metabolizable teórica estimada.

En este sentido, algunos autores indican que el depósito lipídico en las aves depende más del tipo de grasa o aceite añadido a las raciones que de su nivel de inclusión (Sanz et al. 2000; Crespo y Esteve-García 2001, 2002). En la bibliografía no se han encontrado trabajos diseñados para valorar la interacción entre nivel y tipo de grasa añadido a la dieta sobre el depósito de grasa de los pollos. El balance entre ambos factores determinará el grado de engrasamiento de los animales.

Para ello se planteó un experimento cuyo objetivo era estudiar si el consumo de piensos iso-energéticos en energía metabolizable y con diferente grado de insaturación, modifica la retención de energía y grasa en pollos de carne. En concreto, determinar las diferencias en la grasa retenida a través de la realización de un balance con pollos de carne que consumen niveles crecientes de grasas saturadas y poliinsaturadas n-3.

4.4. Material y Métodos

4.4.1. Animales e Instalaciones

Un total de 56 pollos hembra de la estirpe Ross 308 (Terra-Avant, S.A. Inglés, Girona) de un día de edad se alojaron en el suelo por un periodo de 10 días. El día 11 de vida se distribuyeron en jaulas a razón de 5 aves por jaula. El día 26 se separaron en jaulas individuales. Antes de iniciar el balance, 8 animales fueron sacrificados, considerándose animales control inicial. El resto de animales fueron asignados al azar a los distintos tratamientos experimentales. Las instalaciones utilizadas, permitieron el registro de los parámetros productivos y la recogida total de heces.

4.4.2. Piensos y Diseño Experimental

Los 6 piensos experimentales fueron formulados según las recomendaciones del NRC (1994) para presentar la misma energía metabolizable aparente (Tabla 4.1).

Los factores de variación de los piensos fueron:

- Tipo de grasa añadida: S: Sebo, rico en AGS; L: Aceite de linaza, rico en AGPI n-3.
- Nivel de grasa añadida: 3, 6 y 9 %.

Cuando las aves alcanzaron un peso aproximado de 1445 ± 11.0 g, se asignaron 8 animales a cada uno de los 6 tratamientos con un total de 48 animales. El balance tuvo una duración de 21 días, y al finalizar este, las aves alcanzaron un peso aproximado de 2596 ± 218.0 g. Durante los 21 días, se realizó el control de consumo de alimento y se recogieron el total de excretas producidas, con objeto de estimar la cantidad de energía metabolizable consumida a lo largo del periodo experimental.

4.4.3. Controles de Producción y Recogida de Muestras

Durante todo el periodo experimental se realizaron controles de ingestión de pienso y peso de los animales para determinar el consumo medio diario (CMD), ganancia media diaria (GMD) e índice de transformación del alimento (IT). Antes de suministrar los piensos experimentales, 8 animales control fueron sacrificados por inhalación de CO₂, y congelados a -20 °C hasta su análisis. Posteriormente, se procedió a picar y homogeneizar los animales enteros con plumas; una muestra representativa de cada

animal fue liofilizada (Alpha I-6; Christ ®, 336 Osterode/Halz), molida y luego conservada a -20 °C hasta su análisis de composición química y contenido en ácidos grasos. El mismo procedimiento se siguió con los 48 animales enteros (8/tratamiento) a final del experimento. Las excretas se pesaron en su totalidad cada día y durante todo el periodo experimental (21 días), se recogieron y se muestrearon (proporcional al peso total de la excreta) 3 veces por semana. Estas muestras fueron homogenizadas, secadas a 70 °C, liofilizadas y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis. También se recogieron muestras de los piensos experimentales al inicio y al final de la prueba y fueron homogenizadas, molidas y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

Tabla 4.1. Ingredientes y composición nutritiva analizada de los piensos experimentales

%	Sebo (S)			Linaza (L)		
	3	6	9	3	6	9
Tratamiento	S3	S6	S9	L3	L6	L9
HP 300 ¹	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0	32.0
Maíz	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Grasa	3.00	6.00	9.00	3.00	6.00	9.00
Almidón	27.9	22.7	17.5	26.4	19.8	13.1
Exal ²	2.10	4.30	6.50	3.60	7.20	10.90
Ca CO3	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30
F. Bicalc.	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
NaCl	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Colina Cl	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015
DL Met	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Corrector ³	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Materia Seca (%)	91.08	91.64	92.01	90.63	91.31	91.91
Cenizas	8.81	10.82	12.40	10.03	13.48	16.05
Grasa Bruta	4.47	7.46	10.45	4.47	7.46	10.44
Proteína Bruta	21.49	22.02	21.36	21.26	21.41	21.80
Fibra Bruta	2.55	2.67	2.74	2.96	2.68	2.27
Energía Bruta (MJ/kg) ⁴	16.61	17.07	17.10	16.52	16.49	16.70
EMA estimada	12.71	12.71	12.70	12.71	12.72	12.70
EMA determinada	14.66	14.62	14.44	14.55	14.27	14.24

¹HP: Hidrolizado proteico de soja (Andersen, S.A.). ²Exal: Sepiolita (Tolsa, S.A.). ³Corrector vitamínico-mineral por kg de pienso: Vitamina A: 12000 UI; Vitamina D3: 2400 UI; Vitamina E: 30 mg; Vitamina K₃: 3 mg; Vitamina B₁: 2,2 mg; Vitamina B₂: 8 mg; Vitamina B₆: 5 mg; Vitamina B₁₂: 11 µg; Ácido fólico: 1.5 mg; Biotina: 150 µg; Pantotenato cálcico: 25 mg; Acido nicotínico: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Etoxiquin: 150 mg. ⁴Assumiendo 29.288 y 37.656 MJ/kg de sebo y aceite de linaza, respectivamente.

4.4.4. Determinaciones Analíticas

En las muestras de pienso, recogidas a lo largo de la prueba, heces y animal entero se realizó el análisis de humedad, proteína y cenizas (análisis de Weende, AOAC, 1995), la energía bruta mediante calorímetro adiabático (IKA C-400, Janke-Kunkel, Staufen,

Alemania) y se cuantificaron los ácidos grasos aplicando la técnica de transesterificación directa (Surkhija y Palmquist, 1988) para pienso y heces y la técnica de Carrapiso et al. (2000) para las muestras de pollos, grasas y aceites.

La suma del total de ácidos grasos de cada muestra fue utilizada como estimación del total de grasa (g por kg de muestra analizada) de acuerdo a Cortinas et al. (2004) y Villaverde et al. (2005). El perfil en ácidos grasos de los piensos se muestra en la Tabla 4.2.

4.4.5. Cálculos

1. Los resultados de energía de las excretas junto a los obtenidos del análisis de la energía bruta de los piensos experimentales, se utilizaron para estimar la cantidad de EM ingerida a lo largo del balance (21 días).
 - a) Determinación del porcentaje de energía metabolizable aparente (EMA) del pienso: $\% \text{EMA} = ((E \text{ consumida} - E \text{ excretada}) / E \text{ consumida}) \times 100$
 - b) Se estimaron los valores de energía metabolizable ingerida (EMI) durante 21 días: $\text{EMI} = \% \text{EMA} \times \text{kg pienso consumidos}$.
2. Para los cálculos del coeficiente de digestibilidad de la grasa (% GD), grasa digestible consumida o aparentemente absorbida (GA) se siguieron los mismos pasos descritos en el apartado anterior (1).
3. Para los cálculos del coeficiente de digestibilidad del nitrógeno (% N), nitrógeno digestible consumido o aparentemente absorbido (NA) se siguieron los mismos pasos descritos en el apartado 1.
4. La energía retenida en el animal se calculo a través de los resultados obtenidos en la determinación del contenido energético inicial del animal entero (EI, media de 8 aves control) y al final (EF) del periodo experimental de balance: $\text{ER animal} = \text{EF} - \text{EI}$.
5. La cantidad de grasa retenida (GR) a lo largo del balance se estimó a partir de su composición química utilizando la siguiente formula: $\text{g GR} = [\text{kJ ER animal} - (\text{g PB retenida} \times 23,6 \text{ kJ/kg})] / 39,3 \text{ kJ/kg}$.
6. Para el cálculo de la cantidad de nitrógeno retenido se siguieron los mismos pasos descritos en el apartado anterior.

Tabla 4.2. Perfil en ácidos grasos de los piensos experimentales (g/kg)¹

Ácidos Grasos ³	Piensos Experimentales ²					
	S3	S6	S9	L3	L6	L9
AG Totales	44.3	71.3	96.6	45.9	72.0	97.2
AGS	17.2	31.7	45.2	6.73	9.80	12.0
AGI	27.0	39.6	51.3	39.2	62.2	85.1
AGMI	14.7	26.3	36.9	10.1	16.5	22.2
AGPI	12.3	13.3	14.4	29.1	45.7	62.9
ω9	13.3	23.1	32.5	9.61	15.8	21.2
ω6	11.3	12.2	13.1	15.0	19.1	22.5
ω3	1.01	1.14	1.38	14.1	26.6	40.4
ω6/ω3	11.2	10.7	9.46	1.07	0.72	0.56
AGS/AGI	0.66	0.88	0.88	0.17	0.16	0.14

¹Media de dos determinaciones. ²S: Piensos con 3, 6 o 9 % de sebo añadido; L: Pienso suplementado con 3, 6 o 9 % de aceite de linaza. ³AG: ácidos grasos; AGS: ácidos grasos saturados; AGI: ácidos grasos insaturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; ω9: ácidos grasos n-9; ω6: ácidos grasos n-6; ω3: ácidos grasos n-3.

4.4.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los distintos parámetros estudiados se utilizó el procedimiento GLM del SAS[®] versión 9.1 (SAS Inst., Inc., Cary, NC). El análisis de varianza fue utilizado para determinar si existían diferencias en el efecto de los factores principales: tipo de grasa (sebo, linaza) y nivel de inclusión de grasa (3, 6, 9 %) sobre los parámetros estudiados. La unidad experimental en todos casos fue el individuo. Las medias entre tratamientos se compararon usando el test de Tukey. En todos los casos, valores de $\alpha = 0.05$ se utilizaron para detectar diferencias significativas. Para estimar la eficiencia de utilización de la grasa digestible, la relación entre ingerido y retenido fue determinada mediante el procedimiento REG del mismo paquete estadístico.

4.5. Resultados y discusión

El peso vivo medio al inicio y final del periodo experimental fue de 1445 ± 11 y 2596 ± 218 g, respectivamente. Los resultados productivos registrados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tipos de grasa añadida (Tabla 4.3). Estos resultados concuerdan con los datos de otros autores (Sanz et al., 1999; Crespo y Esteve-García, 2002) que indican que el tipo de grasa dietética no tiene ningún efecto en las características productivas de los animales, siempre y cuando la relación entre la energía y la proteína, así como con el resto de nutrientes de la ración, se mantenga y sea equilibrada (Fuller and Rendon, 1977).

En cuanto al nivel de grasa añadida, tanto la GMD como el CMD y el correspondiente peso vivo final aumentaron conforme se incrementaba el nivel de inclusión de grasa. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al IT para ninguno de los factores de variación estudiados. A mayor cantidad de grasa añadida al pienso, las aves consumían más y crecían más. Está bien establecido que la adición de grasa mejora la palatabilidad del pienso, pero además, en este caso, los piensos altos en grasa presentaban una menor EMA (Tabla 4.1). Los pollos son capaces de regular el consumo de alimento en función de la concentración energética del mismo. Así, si disminuye la concentración energética del pienso, el pollo aumentará la cantidad de pienso consumido.

En la Tabla 4.4, presentamos los resultados relativos al balance de energía, expresados en kJ por 100g de ganancia de peso durante los 21 días del balance. Se puede observar la EMI y la ER en función de los distintos tratamientos.

En relación al nivel de grasa añadida, la EMI disminuyó con el nivel de inclusión de grasa. En cuanto a la ER, podemos observar cómo la retención energética aumenta conforme incrementamos la cantidad de grasa incorporada a la fórmula. En concreto, los piensos con mayores niveles de grasa presentaban más ER con menor EMI por ganancia de peso. Estas diferencias se explican por la mayor eficiencia energética de la grasa para la retención en comparación con los carbohidratos o la proteína, es decir el menor incremento térmico de este nutriente. En relación al tipo de grasa, podemos observar que la EMI fue similar para los animales, independientemente de que consumieran grasa saturada o poliinsaturada (3045 kJ/ 100g). A pesar de ello, los resultados de este balance indican, que la incorporación de una grasa saturada en la ración (S) da lugar a una mayor cantidad de ER en comparación con la inclusión de materias grasas ricas en AGPI (S: 1009 vs. L: 906 kJ/100g; $P=0.0061$).

En cuanto al balance de grasa, en la Tabla 4.5, se presenta los g de grasa digestible ingerida y grasa retenida por 100 g de incremento de peso vivo. Lógicamente, conforme aumentamos el nivel de grasa de la ración, aumenta la cantidad de grasa digestible ingerida por el animal. Por otro lado, los animales que consumen grasa saturada tienen menor ingestión de grasa digestible que los animales del tratamiento L, ya que las grasas saturadas frente a las poliinsaturadas tienen un menor porcentaje de digestibilidad. Sin embargo, los animales que consumen grasa saturada retienen más

grasa en el cuerpo que los pollos que consumen grasa poliinsaturada (S: 11.2 g vs. L: 8.99 g/100 g de ganancia de peso vivo; $P = 0.010$), independientemente del nivel incorporado. De hecho depositan prácticamente todo lo que han absorbido (S: 90 %). Por el contrario, las aves que consumen raciones con mayor grado de poliinsaturación retienen menos grasa de la que han aparentemente absorbido (L: 61 %).

Tabla 4.3. Resultados productivos de pollos de carne alimentados con distintos niveles y tipos de grasa en el pienso durante los 21 días del periodo experimental ¹

Tratamientos ²	Peso final (g)			CMD ³ (g/ave/día)			GMD (g/ave/día)			IT		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	2455	2453	2454 ^b	110	109	110 ^b	48.0	47.8	47.9 ^b	2.35	2.32	2.33
6	2620	2695	2658 ^a	125	132	129 ^a	56.0	60.0	57.8 ^a	2.27	2.23	2.25
9	2618	2736	2676 ^a	128	133	130 ^a	55.9	61.3	58.6 ^a	2.30	2.18	2.24
Valor medio	2564	2628		121	125		53.3	56.2		2.31	2.24	
RSD ⁴	218.4			18.2			10.39			0.231		
TIPO	0.331			0.463			0.331			0.517		
NIVEL	0.013			0.006			0.012			0.343		
Interacción	0.745			0.810			0.749			0.812		

¹Valores que corresponden a las medias de los animales por tratamiento (n= 8). ²S: Pienso con 3, 6 o 9 % de Sebo; L: Pienso con el 3, 6 o 9 % de linaza. ³CMD: consumo medio diario; GMD: ganancia media diaria; IT: índice de transformación. ⁴RSD: Desviación estándar residual.

Tabla 4.4. Efecto de diferentes tratamientos sobre el balance energético de pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental (kJ/100g de ganancia de peso)¹

Tratamientos ²	EMA ingerida			Energía retenida ³		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	3429	3092	3261 ^a	832	878	855 ^b
6	2958	2961	2960 ^{ab}	890	1102	996 ^a
9	3003	2826	2915 ^b	995	1046	1021 ^a
Valor medio	3130	2960		906 ^b	1009 ^a	
RSD ⁴	333.7			132.3		
TIPO	0.111			0.006		
NIVEL	0.025			0.018		
Interacción	0.422			0.181		

¹ Media de 8 determinaciones. ² S: Pienso con 3, 6 o 9 % de Sebo; L: Pienso con el 3, 6 o 9 % de linaza. ³ Energía retenida= Energía del pollo entero al final experimento - Energía del pollo entero al inicio experimento. ⁴RSD: Desviación estándar residual.

Tabla 4.5. Efecto de diferentes niveles y tipos de grasas sobre el balance de grasa en pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental (expresado g por 100g de ganancia)¹

Tratamientos ²	Grasa digestible ingerida			Grasa retenida ³		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	10.1 ^d	8.77 ^d	9.4	6.75	7.79	7.22 ^x
6	14.5 ^{bc}	12.8 ^c	13.6	8.97	14.5	11.7 ^y
9	20.0 ^a	15.9 ^b	17.9	11.4	11.2	11.3 ^y
Valor medio	14.8	12.5		8.99 ^b	11.2 ^a	
RSD ⁴	1.46			3.78		
TIPO	0.001			0.010		
NIVEL	0.001			0.073		
Interacción	0.034			0.136		

¹ Media de 8 determinaciones. ² S: Piensos con 3, 6 o 9 % de Sebo; L: Piensos con el 3, 6 o 9 % de linaza. ³ Grasa retenida= Grasa del pollo entero al final experimento – Grasa del pollo entero al inicio experimento. ⁴RSD: Desviación estándar residual.

Son muy pocos los trabajos dirigidos a determinar la grasa retenida y su variación con el grado de insaturación de la ración. Crespo y Esteve-García (2002b) observaron menores depósitos de grasa para los animales que consumían aceites insaturados, aunque no encontraron diferencias en la energía retenida. Por su parte, Sanz et al (2000), utilizando dos fuentes de grasa (saturada e insaturada), determinaron una mayor retención de energía para los animales alimentados con grasas saturadas. Los resultados de este estudio, indican que el grado de insaturación de la grasa de la ración modifica la energía y la grasa retenida en el animal. Es decir que la energía que deriva de los ácidos grasos puede tener distinto destino metabólico dependiendo de su estructura, y en concreto, de su grado de insaturación.

A continuación se representan las ecuaciones de predicción de la grasa retenida (GR) en función de la grasa digestible ingerida (GA, g/ave) para los animales que consumieron el pienso suplementado con 3, 6 y 9 % de sebo (S) o linaza (L).

$$\text{Pienso S: GR} = 1.05 \pm 0.157 \times \text{GA} - 8.32 \pm 24.8; P < 0.001; R^2 = 0.702.$$

$$\text{Pienso L: GR} = 0.726 \pm 0.135 \times \text{GA} - 16.4 \pm 24.5; P < 0.001; R^2 = 0.590.$$

Al aumentar la grasa absorbida aumenta la grasa retenida, pero el ritmo de incremento es diferente según el grado de insaturación. Las grasas saturadas dan lugar a incrementos de grasa retenida superiores a las grasas poliinsaturadas. Por cada 10 g más de grasa absorbida el incremento en grasa retenida sería de 10.5 g si la fuente de grasa

elegida es el sebo mientras que sería de 7.3 g si incluimos linaza, es decir el incremento en la retención de grasa se reduciría en un 32 %.

El balance de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) se presenta en la tabla 4.6, expresado en g por 100g de ganancia de peso. Las ganancias o pérdidas se han calculado como la diferencia entre los AG retenidos y los absorbidos. Podemos observar como la absorción de las diferentes familias de AG esta directamente relacionada con su ingestión (Tabla 4.6). En relación a los AGS, los animales que consumieron mayoritariamente AGS retuvieron prácticamente lo mismo que absorbieron. Sin embargo, los animales que consumieron mayoritariamente AGPI, retuvieron más AGS de los que absorbieron, lo que indica una síntesis endógena de estos AGS. En cuanto a los AGMI, la cantidad de AGMI retenidos fue mayor que los absorbidos en el tratamiento S, lo que indica una elongación y desaturación de los AGS, mientras que en el caso del tratamiento L retienen prácticamente igual o menos AGMI de los que absorbieron. En cuanto a los AGPI, los animales de los tratamientos S retuvieron prácticamente la misma cantidad de AGPI que habían absorbido. Por el contrario, los animales que consumieron los piensos ricos en AGPI (L) retuvieron una menor cantidad de AGPI de la que absorbieron. Asimismo, podemos ver que al aumentar la insaturación de la grasa del pienso la pérdida de AG es mayor, y se debe fundamentalmente a AGPI.

Estos resultados concuerdan con el trabajo de Crespo y Esteve-Garcia (2002). Lo interesante es la razón por la que se producen estas diferencias en la utilización de AG que difieren en su estructura química. Algunos autores han estudiado los mecanismos metabólicos que ayuden a explicar estas diferencias. En algunos casos indican que los AGPI reducen la lipogénesis hepática y contribuyen a una mayor oxidación de lípidos para la obtención de energía. Otros autores sugieren que la energía metabolizable de los AGPI se utiliza en otros procesos metabólicos diferentes al almacenamiento de energía, como puede ser la termogénesis (Baillie et al., 1999 Takeuchi et al. 1995; Raimbault et al., 2001; Toyomizu et al., 2002).

Tabla 4.6. Efecto de diferentes niveles y tipos de grasas sobre el balance de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental (expresado g por animal)¹

ÁCIDOS GRASOS SATURADOS									
Tratamiento ²	Absorbidos			Retenidos ³			Perdidos ⁴		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	14.0 ^d	33.1 ^c	23.6	26.2 ^b	33.1 ^b	29.7	-12.2	0.0	-6.1
6	21.3 ^d	64.9 ^b	43.1	25.7 ^b	71.9 ^a	48.8	-4.4	-7.0	-5.7
9	28.2 ^{cd}	88.7 ^a	58.8	31.3 ^b	72.2 ^a	51.7	-3.0	16.5	6.7
Valor medio	21.2	62.2		27.7	59.1		-6.6	3.2	
RSD ⁵	4.64			19.50			16.44		
TIPO	<0.0001			<0.001			0.073		
NIVEL	<0.0001			0.013			0.105		
Interacción	<0.0001			0.027			0.233		
ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS									
Tratamiento ²	Absorbidos			Retenidos ³			Perdidos ⁴		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	22.0 ^c	30.3 ^{de}	26.2	25.5 ^b	37.7 ^b	31.6	-3.4	-7.4	-5.4 ^b
6	37.6 ^d	66.9 ^b	52.2	22.3 ^b	92.1 ^a	57.2	15.2	-25.3	-5.0 ^b
9	53.8 ^c	92.6 ^a	73.2	29.3 ^b	86.4 ^a	57.9	24.5	6.3	15.3 ^a
Valor medio	37.8	63.3		25.7	72.1		12.1 ^a	-8.8 ^b	
RSD ⁵	5.66			26.07			21.78		
TIPO	<0.0001			<0.0001			0.005		
NIVEL	<0.0001			0.020			0.036		
Interacción	<0.0001			0.018			0.102		
ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS									
Tratamiento ²	Absorbidos			Retenidos ³			Perdidos ⁴		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	66.7 ^c	23.5 ^d	45.1	38.4	12.8	25.6 ^b	28.3 ^{bc}	10.8 ^c	19.5
6	108.0 ^b	30.8 ^d	69.4	61.9	15.9	38.9 ^{ab}	46.2 ^b	14.9 ^c	30.6
9	158.0 ^a	33.3 ^d	95.6	89.3	25.8	57.5 ^a	68.7 ^a	7.60 ^c	38.1
Valor medio	111.0	29.2		63.2 ^a	18.1 ^b		47.7	11.1	
RSD ⁵	11.54			20.03			15.96		
TIPO	<0.0001			<0.0001			0.020		
NIVEL	<0.0001			0.001			<0.0001		
Interacción	<0.0001			0.073			0.006		

¹ Media de 8 determinaciones. ² S: Piensos con 3, 6 o 9 % de Sebo; L: Piensos con el 3, 6 o 9 % de linaza.

³ AG retenidos= AG del pollo entero al final experimento – AG del pollo entero al inicio experimento.

⁴AG perdidos = AG absorbidos- AG retenidos. ⁵RSD: Desviación estándar residual.

En la Tabla 4.7 se presenta el balance de nitrógeno en el animal en gramos por 100 g de ganancia de peso, durante los 21 días de experimento. Los resultados de este experimento, al igual que los resultados de otros experimentos llevados a cabo en nuestra unidad (Villaverde et al. 2005; Kavouridou et al. 2008), indican que la inclusión de diferentes tipos de grasa no afecta de forma significativa la ingestión y la retención de nitrógeno. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con los resultados de otros autores. Crespo y Esteve-García (2002) encontraron que las aves que consumieron

raciones más saturadas registraron mayor consumo y excreción de nitrógeno, con el resultado de una menor utilización del nitrógeno procedente de la ración. Por otro lado, Sanz et al. (2000), observaron que el tipo de grasa añadida a la ración afectaba el total de proteína retenida. A igual ingestión de nitrógeno y peso vivo final, los animales que consumieron las raciones más saturadas registraron un mayor depósito de grasa y una menor retención de proteína comparados con los que consumieron raciones ricas en ácidos grasos poliinsaturados.

Por lo que se refiere al efecto del nivel, la cantidad de nitrógeno retenido disminuye conforme aumenta el nivel de grasa añadida. Este resultado indica que existen diferencias de utilización y de distribución del nitrógeno dependiente del nivel de grasa añadido a la ración.

Tabla 4.7. Efecto de diferentes niveles y tipos de grasas sobre el balance de nitrógeno en pollos de carne durante los 21 días de periodo experimental (g/100g de ganancia de peso vivo)¹

Tratamientos ²	Nitrógeno absorbido			Nitrógeno retenido ³		
	L	S	Valor medio	L	S	Valor medio
3	3.67	3.76	3.71	3.64	3.61	3.62 ^a
6	3.50	3.39	3.42	3.38	3.20	3.29 ^b
9	3.62	3.33	3.47	3.25	3.20	3.23 ^b
Valor medio	3.59	3.48		3.42	3.34	
RSD ⁴	0.509			0.335		
TIPO	0.430			0.411		
NIVEL	0.238			0.004		
Interacción	0.559			0.813		

¹ Media de 8 determinaciones. ² S: Piensos con 3, 6 o 9 % de Sebo; L: Piensos con el 3, 6 o 9 % de linaza. ³ N retenido= N del pollo entero al final experimento – N del pollo entero al inicio experimento. ⁴RSD: Desviación estándar residual.

4.6. Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran que la utilización de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados da lugar a menor retención de grasa y energía en el pollo de carne. Nuestros datos sugieren que la EMA de los piensos con grasa saturada se utiliza más eficientemente para el depósito de grasa en el organismo que en el caso de la EMA de los piensos ricos en AGPI. En cuanto al balance de ácidos grasos, con el consumo de grasa rica en AGPI (L) se retuvieron más AGS de los que se absorbieron, pero por el contrario, se depositaron menos AGPI de los que se absorbieron. Parte de estos AGPI de los que dispone el organismo se gastan en otros destinos metabólicos diferentes al

almacenamiento de energía en los depósitos de grasa del animal. Estos resultados indican que los pollos que consumieron las dietas altamente poliinsaturadas depositaron menos grasa y esta disminución fue a causa de una menor retención de los ácidos grasos poliinsaturados.

CAPITULO 5

Dietary *n*-3 Fatty Acids are Associated with Lower Fat Deposition, Higher Lipid β -Oxidation and Higher T3 Thyroid Hormone Levels when Compared to Dietary Saturated Fatty Acids in Chickens

Ferrini¹ G., D. Menoyo², E. Esteve-Garcia³, M. D. Baucells¹, E. G. Manzanilla⁴,
and A.C. Barroeta¹

¹Grup de Recerca en Nutrició, Maneig i Benestar Animals. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Edifici V 08193-Bellaterra, Barcelona. Spain.

²Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos (ETSIA). 28040-Madrid, Spain

³Nutrición Animal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Mas de Bover, 43120-Constantí, Spain

⁴Department of Animal Science, University of California, Davis, CA, 95616, USA

2009 Livestock Science

5.1. Abstract

The effects of n-3 fatty acids (FA) on lipid metabolism were studied in chickens. Serum thyroid hormones (T3, T4) and lipoprotein-lipase (LPL), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), malic enzyme (ME), and L-3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (L3HOAD) activities were studied in chickens fed three diets: a basal diet low in fat and energy (BS) and two diets rich in n-3 poly-unsaturated FA (10 % linseed oil; LO) or in saturated FA (10 % tallow; TA). Dietary FA profiles resulted in different profiles of FA in the tissues. The BS diet caused lower LPL activity and fat deposition compared to the other diets. Chickens fed the LO diet showed lower abdominal fat and higher L3HOAD activities (β -oxidation) and serum T3 levels than those fed the TA diet. There were no differences in enzymes activities related to lipid synthesis. Lipid β -oxidation may be more relevant than synthesis of FA in the lower fat deposition caused by n-3 FA compared to saturated FA in chicken diets. Higher serum T3 suggests a role of this hormone in the lower fat deposition caused by LO.

Keywords: Broiler, fat depot, lipid metabolism, lipoprotein-lipase, thyroid hormone

5.2. Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del nivel de insaturación de los ácidos grasos de la ración sobre algunos parámetros del metabolismo lipídico en pollos de carne. Para ello se determinaron las hormonas tiroideas (T3, T4) en suero y la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa (LPL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima málico (ME) y L-3-hydroxyacyl CoA deshidrogenasa (L3HOAD) en tejido adiposo, hígado y corazón. Los piensos experimentales utilizados fueron constituidos por un pienso bajo en grasa (BS: 0.5 % de aceite de girasol) y dos piensos con el 10 % de linaza (LO), rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3, y el 10 % de sebo (TA), rico en ácidos grasos saturados. El perfil en ácidos grasos de los tejidos estudiados fue el reflejo del perfil en ácidos grasos de la ración. El pienso BS causó una menor actividad de LPL y, por consiguiente, una menor deposición de triglicéridos en la grasa abdominal en comparación con los piensos LO y TA. Los pollos alimentados con LO registraron un menor depósito de grasa abdominal, una mayor actividad de la L3HOAD (β -oxidación), y un aumento de la hormona T3 circulante comparados con las aves alimentadas con un pienso rico en ácidos grasos saturados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la actividad de la EM y la L3HOAD involucrada en la síntesis *de novo* de lípidos. Los resultados del experimento sugieren que el menor depósito de grasa que se produce al consumir ácidos grasos poliinsaturados n-3 en comparación con ácidos grasos saturados se debe más a una diferencia en la tasa de β -oxidación de los ácidos grasos que a una diferencia en el ritmo de síntesis. El aumento de los niveles de T3 con el consumo de grasa poliinsaturada sugieren el importante papel de esta hormona podría en la reducción de la cantidad de grasa depositada en el organismo.

Palabras clave: Pollos, depósito de grasa, metabolismo lipídico, LPL, hormonas tiroideas

5.3. Introduction

It is well established that, as dietary fat increases, the lipid composition of a chicken's body resembles more the composition of dietary fat (Villaverde et al., 2006). In addition, chickens fed diets rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) show lower body fat than chickens fed diets with similar metabolizable energy levels but rich in saturated fatty acids (SFA) (Villaverde et al., 2006). Therefore, the fatty acid composition of dietary lipids influences not only the composition of fat deposition, but also the amount of fat to be deposited or oxidized.

Once in the blood, triglycerides in the portomicrons and very-low-density lipoproteins are hydrolyzed by lipoprotein lipase (LPL) in order to enter the tissues. The LPL activity can represent a limiting step for the entry of dietary fatty acids (FA) into the tissues (Bensadoun 1991), and the consumption of diets rich in n-6 PUFA has been shown to increase the LPL activity in heart and soleum muscle in rats (Shimomura et al., 1990). However, no dietary effect on LPL activity has been described in chickens so far. Once FA enter the tissues, they can be oxidized to obtain energy. L-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (L3HOAD) activities in heart can be used to show changes in mitochondrial fatty acid oxidation level (Sanz et al., 2000). On the other hand, FA can be synthesized by the liver of chickens. The balance between synthesis and oxidation will determine the amount of FA retained. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and malic enzyme (ME) provide the reducing equivalents in the form of NADPH for this *de novo* lipogenesis in the liver, and thus these enzymes can be used as principal indicators of lipid biosynthetic activity (Alvarez et al., 2000).

How PUFA induce changes in lipid metabolism is not totally understood. Thyroid hormones play an important role in the regulation of lipid metabolism in avian species showing a biphasic effect: at low concentrations they induce anabolic responses while at higher concentrations they have opposite effects (Decuypere et al., 2005). However the effect of dietary PUFA or SFA on thyroid hormones in chickens has not been investigated.

Knowing that n-3 PUFA decrease fat deposition in the chicken, the aim of this study was to determine the effect of the n-3 PUFA family in the different steps of the

metabolism of lipids in broiler chickens, as described for n-6, and assess if thyroid hormones are affected by the inclusion of n-3 PUFA in the diet compared to SFA.

5.4 Materials and methods

5.4.1. *Animals and diets*

The experiment was approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain). A total of 18 Ross 308 female broiler chickens (Terra-Avant S.A., Girona, Spain) were used in this experiment. Animals were separated in individual cages and fed one of the three experimental diets until day 36 of age. Animals were raised under controlled conditions of temperature, humidity and ventilation as recommended by the breeder. The diets were formulated according to NRC requirements (NRC 1994). The three diets were basal diet (BS) containing 0.5 % sunflower oil, tallow diet (TA: rich in SFA) containing 10 % of tallow, and linseed diet (LO: rich in n-3 PUFA) containing 10 % linseed oil. Tallow and oils were obtained from Cailà-Parés, S.A. (Barcelona, Spain). Ingredients and nutrient composition of diets are shown in Table 5.1.

5.4.2. *Controls and sampling*

Diets were analyzed for Weende (AOAC 2000), gross energy (Adiabatic calorimetric bomb (IKA-Kalorimetersystem C4000, Staufen, Germany), and FA content. On day 36, 6 birds per treatment were bled (6ml) by wing puncture. Samples were immediately centrifuged at 3500×g for 15 min, and stored at -80 °C. Chickens were weighed, killed by lethal injection (sodium pentobarbitate, 200 mg/kg), and liver, heart and abdominal fat pad (from the pro-ventriculus surrounding the gizzard down to the cloaca) were immediately removed and weighed. Two representative samples of each tissue were taken. One was packed in Cryovac CN300 bags (Cryovac, Sant Boi de Llobregat, Spain), frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for the analysis of enzyme activity. The second sample was freeze-dried, ground, and frozen at -20 °C for the analysis of fatty acid content.

Table 5.1. Ingredients and nutrient composition of experimental diet¹

Ingredient, g/kg	Treatments		
	BS	TA	LO
Wheat	688	553	553
Soybean meal (48%)	266	311	311
Tallow	-	100	-
Sunflower oil rich in oleic	-	-	-
Sunflower oil rich in linoleic	5.00	-	-
Linseed oil	-	-	100
DL-Methionine (99%)	2.50	2.50	2.50
L-Threonine	0.30	0.00	0.00
L-Lysine	2.30	1.30	1.30
Calcium Carbonate	16.5	12.5	12.5
Dicalcium phosphate	11.4	12.5	12.5
Salt	4.00	3.20	3.20
Vitamin and mineral premix ²	4.00	4.00	4.00
<i>Nutrient composition analyzed</i>			
Gross energy, kcal/kg of feed	4.394	4.761	4.832
Dry matter, g/kg diet	901	909	909
Crude protein, g/kg diet	212	209	217
Ether extract, g/kg diet	19.0	104	126
SFA, % of total fat	20.7	50.3	10.7
MUFA, % of total fat	17.6	36.9	17.5
PUFA, % of total fat	61.7	12.8	71.8
PUFA:SFA, % of total fat	2.99	0.25	6.72
Gross energy, kcal/kg of feed	4.394	4.761	4.832
Dry matter, g/kg diet	901	909	909
Crude protein, g/kg diet	212	209	217
Ether extract, g/kg diet	19.0	104	126
SFA, % of total fat	20.7	50.3	10.7
MUFA, % of total fat	17.6	36.9	17.5
PUFA, % of total fat	61.7	12.8	71.8
PUFA:SFA, % of total fat	2.99	0.25	6.72
Gross energy, kcal/kg of feed	4.394	4.761	4.832

¹BS: basal diet; TA = diet with 10% of added tallow; LO = diet with 10% of added linseed oil; SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

² Provided per kg of diet: vitamin A: 12,000 IU; vitamin D3: 2,400 IU; vitamin E: 30 mg; vitamin K3: 3 mg; vitamin B1: 2.2 mg; vitamin B2: 8 mg; vitamin B6: 5 mg; vitamin B12: 11 µg; folic acid: 1.5 mg; biotin: 150 µg; calcium pantothenate: 25 mg; nicotinic acid: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Ethoxyquin: 150 mg.

5.4.3. Chemical analysis and enzyme activities

The FA content of feeds was determined according to Sukhija and Palmquist (1988). Total FA were determined by direct transesterification (Carrapiso et al., 2000) in liver, heart and abdominal fat. Briefly, samples were incubated at 70°C with methanolic chloride and the organic layer was extracted with toluene. Nonadecanoic acid (Sigma, St. Louis, MO) was added as an internal standard. The heptane extracts were injected in

a Gas-Chromatograph (HP6890, Agilent, Waldbronn, Germany) following the method conditions described by Cortinas et al. (2004). Peak areas were integrated and converted to concentrations (g/Kg) by comparison with the internal standard peak area using the formula: Concentration FA X = (Area FA X / Area C19) × (µg C19 / (RC × simple weight)), where FA X is the single FA and RC is the response coefficient. Identification of FA was made comparing the retention times of the simple peaks with the retention time of the standards (Supelco 37 component FAME Mix, Sigma, St. Louis, MO). Total thyroid hormones (T3 and T4) were determined in serum by chemiluminescence DPC in Immulite (Babson et al., 1991). The activities of liver, heart muscle and abdominal fat LPL (EC 3.1.1.34) were determined following Ramirez et al. and Burgaya et al. (Ramirez et al., 1985; Burgaya et al., 1989) and results (mU = nmol of oleate per minute) were expressed as units per 100 grams of live weight. The specific activities of G6PDH (EC 1.1.1.49) and ME (EC 1.1.1.40) were measured in liver according to Alvarez et al. (2000). The activity of L3HOAD (EC 1.1.1.35) was measured in heart muscle as described by Sanz et al. (2000). The specific enzyme activities were expressed in mIU per mg of soluble protein.

5.4.4. Statistical analysis

Results were analyzed using the GLM procedure of SAS version 9.1 (SAS Inst., Inc., Cary, NC) including diet in the model as a classification factor. The bird was the experimental unit. The alpha level for significance was 0.05 and diet means were compared using Tukey's correction.

5.5. Results

Chickens fed the BS diet had lower body weight (1788 vs. 1990 and 1938 g; SEM = 44.1, $P < 0.05$) and fat pad ($P < 0.05$; table 5.2) than those fed diets TA and LO, with 10 % added fat. No differences in final body weight were found between animals fed LO and TA diets, however, chickens fed LO showed lower abdominal fat weights than those fed TA ($P < 0.01$). Liver and heart muscle weight were not affected by treatments.

Total FA content (Table 5.2) was higher in abdominal fat pad (77.3 ± 1.02 %) followed by heart (15.0 ± 0.89 %) and liver (10.1 ± 0.58 %). Treatments did not affect abdominal fat and heart FA content, but chickens fed the TA diet presented higher FA values in

liver compared to those fed LO ($P < 0.01$) and BS diets ($P < 0.01$). Concerning the different families of FA, the SFA and monounsaturated fatty acids (MUFA) were higher in all tissues from animals fed the TA diet followed by those fed the BS diet. PUFA were higher in the tissues of chickens fed the LO diet. Thus, PUFA:SFA ratio had the highest value for the LO diet, with a greater ratio for the abdominal fat (LO: 3.37 ± 0.152), followed by heart muscle (LO: 1.98 ± 0.162) and liver (LO: 1.01 ± 0.042).

Table 5.2. Effect of dietary fatty acid on the total fat and the fatty acid content of abdominal fat pad, liver, and heart ($n = 6$)¹

	BS	TA	LO	SEM	<i>P</i> value
Total fat in the organs, g/100g of BW					
Abdominal fat	0.84 ^c	1.51 ^a	1.22 ^b	0.096	*
Liver fat	2.42	2.42	2.57	0.141	NS
Heart fat	0.52	0.51	0.58	0.029	NS
Fatty acids in abdominal fat pad, g/kg of tissue					
Total Fatty Acids	767	776	775	18.7	NS
SFA	237 ^b	264 ^a	131 ^c	5.9	***
MUFA	420 ^a	445 ^a	201 ^b	13.92	***
PUFA	111 ^b	65.8 ^c	441 ^a	7.68	***
PUFA:SFA	0.47 ^b	0.25 ^b	3.37 ^a	0.088	***
Fatty acids in liver, g/kg of tissue					
Total Fatty Acids	95.4 ^b	124 ^a	85.6 ^b	7.02	**
SFA	41.2 ^b	50.2 ^a	35.9 ^b	2.62	*
MUFA	28.9 ^b	50.0 ^a	13.8 ^c	4.26	**
PUFA	25.3 ^b	24.3 ^b	35.9 ^a	1.26	***
PUFA:SFA	0.61 ^b	0.50 ^b	1.01 ^a	0.038	***
Fatty acids in heart, g/kg of tissue					
Total Fatty Acids	132	158	157	14.2	NS
SFA	43.8 ^b	55.7 ^a	40.8 ^b	3.56	*
MUFA	48.8 ^b	72.9 ^a	35.5 ^b	7.74	**
PUFA	39.3 ^b	29.5 ^b	81.2 ^a	5.37	***
PUFA:SFA	0.91 ^b	0.54 ^c	1.98 ^a	0.100	***

¹BS: basal diet; TA = diet with 10% of added tallow; LO = diet with 10% of added linseed oil, FA = fatty acids; SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids. ^{a-c} Mean values in the same row with no common superscripts are significantly different; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

No differences were found in serum concentration of T4 and T3 (Table 5.3) between animals fed the BS diet and animals fed the TA and LO diets. However, T3 was higher in animals fed the LO diet than in those fed the TA diet ($P < 0.05$). Abdominal fat LPL was higher than heart and liver LPL in all treatments but was not affected by the fat source. However, birds fed the BS diet had lower abdominal fat LPL ($P < 0.05$) and total LPL ($P < 0.05$) activity, and tended to have lower liver LPL activity ($P < 0.10$), compared to birds fed the TA and LO diets. The ME activity was greater than G6PDH activity, but there were no differences among treatments. L3HOAD activity was higher

in chickens fed the LO diet than in those fed the TA and BS diets ($P < 0.001$).

Table 5.3. Serum concentration of thyroid hormones, lipoprotein lipase activity (mU/100 g BW) in different tissues, and activity (mUI/mg protein) of liver glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), malic enzyme, and heart L-3-hydroxyacyl-Coa dehydrogenase (L3HOAD) ($n = 6$)¹

	BS	TA	LO	SEM	P value
T3 (pmol/mL)	1.39 ^{ab}	0.82 ^b	2.35 ^a	0.375	*
T4 (pmol/mL)	2.03	3.89	2.10	0.991	NS
Lipoprotein Lipase					
Liver	30.1	74.4	81.6	16.87	NS
Heart	321	267	302	38.0	NS
Abdominal fat pad	578 ^b	1073 ^a	942 ^a	77.7	**
Total	929 ^b	1415 ^a	1325 ^a	74.9	**
L3HOAD	9.01 ^b	7.77 ^b	15.40 ^a	1.202	**
G6PD	5.95	5.24	4.77	0.656	NS
Malic enzyme	34.8	35.1	28.2	4.27	NS

¹BS: basal diet; TA = diet with 10% of added tallow; LO = diet with 10% of added linseed oil; T3 = triiodothyronine; T4 = thyroxine.

^{a-c} Mean values in the same row with no common superscripts are significantly different; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

5.6 Discussion

Fatty acid composition of chicken tissue is determined by a combination of *de novo* synthesis and direct deposition of FA. Both, SFA and MUFA, have this double origin, whilst PUFA only have a dietary origin. In chickens fed the BS diet a large portion of the deposited FA was SFA and MUFA mainly from *de novo* synthesis of FA. In animals fed the TA and LO diets, the proportion of FA classes found in the tissues paralleled the proportion of FA classes of the fat added to the diets. However, in animals fed the LO diet, PUFA:SFA ratio was greater for the abdominal fat, followed by heart muscle, and liver. This suggests different deposition and/or utilization of PUFA in the different tissues.

Abdominal fat pad has been shown to be highly correlated with the total body fat content (Becker et al., 1979), and consequently, the significant reductions in the abdominal fat weight would reflect a lower total body fat content as shown in previous reports (Crespo and Esteve-Garcia, 2001; Villaverde et al., 2006). Chickens fed the BS diet and the diet containing LO had lower abdominal fat weight than birds fed a diet containing tallow, as expected. The difference in abdominal fat weight between animals

fed SFA (TA) and those fed n-3 FA (LO) was as pronounced as the difference between animals fed LO and BS diets. It is remarkable that a difference in fat source in diets with similar energy levels can produce changes in fat deposition as important as the changes produced by drastic reductions in the amount of fat and energy. This phenomenon is still not totally understood.

Variations in LPL activity could be a first step involved in the regulation of fat depots. Studies using *in vitro* techniques or forced feeding of emulsion fat (Sato et al., 1999; Sato and Akiba, 2002) have shown that LPL synthesis and activity in abdominal adipose tissue decreases with increasing fatty acid unsaturation. However, LPL activity has not been shown to be affected by dietary treatments under normal feeding conditions. Sato and Akiba (2002) were not able to measure any variation of the liver LPL mRNA expression feeding chickens with different fat sources or even fasting the animals. An important point is that in mammals (Vilaro et al., 1988), and probably in chickens, LPL may come from the extra-hepatic tissues to be metabolized in the liver, masking possible differences. Thus, effects of dietary PUFA on LPL activity in chicken liver cannot be discarded. In the present experiment, LO and TA diets showed no difference in LPL activity in any tissue in accordance with results reported by Sato et al. However, we found a lower LPL activity in the fat pad of chickens fed the BS diet. This is an interesting finding indicating that LPL activity can be modified by some dietary changes in chickens. Thus, LPL activity represents a regulated step for the entry of dietary FA in the tissues and this activity increases when adding fat/energy to the diet. Therefore, LPL can play an important role in the formation of lipid depots.

Liver weight did not present differences between chickens fed a diet rich in n-3 PUFA and chickens fed a diet rich in SFA or BS. However, the liver lipid content of broilers fed TA was higher than those fed LO, without changes in liver ME and G6PDH activities. This suggests that *de novo* fatty acid synthesis may not be responsible for the changes in fat deposition. The lower liver lipid content in animals fed dietary n-3 PUFA could be the consequence of the higher oxidation rate of these PUFA (Madsen et al., 1999) but it could also be related to a higher direct deposition of dietary SFA (Sanz et al., 2000) compared to PUFA. In contrast with these results, Crespo and Esteve-Garcia (2002) found that dietary linseed oil produces lower fat deposition but higher *de novo* fatty acid synthesis in liver.

In myocardium, FA may enter a pool for temporary storage, but their main fate is to be oxidized (Fielding and Frayn, 1998). Results showed that the experimental treatments did not affect final weight and FA content of the heart. However, L3HOAD activity was significantly higher in chickens fed the LO diet suggesting that oxidation of FA was greater in chickens fed a diet with high levels of n-3 PUFA. Sanz et al. (2000) measured L3HOAD and CPTI activity in heart extract of chickens, and found that diets rich in PUFA seem to increase β -oxidation of FA too.

Other mechanisms, such as the avian uncoupling proteins (avUCP), may also be involved in the effects of n-3 PUFA which happens in mammals (Baillie et al., 1999). The expression of avUCP is strongly regulated by thyroid status in the chicken and elevated plasma T3 increases heat production (Gabarrou et al., 1997; Collin et al., 1997). Data from this study also suggest that a diet rich in n-3 PUFA increases serum T3 concentrations. This increase could be mediated by up/down-regulation of enzymes involved in the biosynthesis (thyroid peroxidase) or degradation (monodeiodinase) of thyroid hormone by n-3 PUFA, as has been shown in rats (Lachowicz et al., 2008). Kahl et al. (1998) studied the effect of two levels of dietary fat (corn oil; 47 vs. 114 g/kg diet) and suggested that the generation of T3 by T4 in broiler chickens is also stimulated by increased dietary MUFA. Then, in agreement with these and other authors (Rosebrough et al., 1999; Collin et al., 2007), thyroid hormones may be affected by dietary fat composition and play an important role in lipid metabolism in poultry. However, it still needs to be clarified whether T3 is a cause or a consequence in the changes induced by n-3 PUFA in lipid metabolism.

Results of the present study indicate that the reduction in abdominal fat observed in chickens fed a diet rich in n-3 PUFA compared to SFA may be a result of increased fatty acid oxidation rather than decreased *de novo* synthesis. The changes in the levels of T3 suggest a role of this hormone in the decrease in fat deposition caused by LO. These results show a new possibility in the mechanism of action of n-3 FA in chickens for future experiments. The change in LPL activity when a low fat diet is used should also be considered.

CAPITULO 6

n-3 Polyunsaturated Fatty Acids do not Affect Efficiency of Energy Utilization for Growth (*Kg*) but Increases Maintenance Energy Requirement in Broiler Chickens

Ferrini¹ G., M. Lachica², A. C. Barroeta¹, J. F. Aguilera², E.G. Manzanilla³, and J. Gasa¹

¹ Grup de Nutrició, Maneig i Benestar Animal. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Edifici V, 08193-Bellaterra, Barcelona. Spain.

³ Instituto de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Camino del jueves s/n, 18100-Armilla, Granada. Spain

³Department of Animal Science. University of California, Davis, USA.

6.1 Abstract

Two experiments were conducted in broiler chickens to determine whether n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) modify efficiency of utilization of apparent metabolizable energy (AME) for growth compared to saturated fatty acids (SFA). In experiment 1, the comparative slaughter method was followed. At 1446 ± 6.4 g of weight and during 21-d, 4 groups of 8 birds were fed *ad libitum* or restricted two diets containing either 9 % of tallow (PUFA/SFA, 0.32; diet T, 10.5 % of ether extract, EE) or 9 % of linseed oil (PUFA/SFA, 5.19; diet LO, 10.4 % of EE). Total retained energy (RE) was lower ($P \leq 0.05$) in LO compared to T (345 vs. 457 kJ/bird/d; $P = 0.007$), in parallel with a lower RE as fat (255 vs. 369 kJ/100g weight gain; $P = 0.067$). This difference was not affected by the dietary restriction. As a consequence, the efficiency of utilization of AME for growth (kg), calculated as the slope of the linear regression of RE on apparent metabolizable energy intake (AMEI), was not different between diets but intercept was higher for animals fed tallow, indicating a constant higher fat deposition independently of the AMEI. In Expt. 2, gaseous exchange measurements were performed. Three groups of 8 birds were fed *ad libitum* or restrictedly a control diet (C: 2.6 % of EE) or one of two diets containing 9% of tallow (diet T, 11.1% of EE) or 9 % of linseed oil (diet LO, 11.0 % of EE). Between days 39 and 52 of age heat production (HP) of each group was measured twice at each of the two levels of feeding in respirometric chambers for 24 hours. Chickens fed LO had lower abdominal fat pad than those T diet (32 vs. 25 g; $P = 0.005$). However, HP was not different between these two diets. The results of these experiments indicate that n-3 fatty acids reduce energy retention compared to saturated fatty acids when the animals are fed both, *ad libitum* or restricted, and there is no difference in the efficiency of utilization of the AMEI between the fats. Thus, a higher maintenance energy requirement is inferred for chickens fed n-3 FA vs. SFA. This effect of n-3 FA in fat deposition could have applications in managing the fat in the chicken carcass and points interesting conclusions to be studied in mammals in the future.

Key words: Broiler chickens, dietary fatty acid, energy partition

6.2. Resumen

Se realizaron 2 experimentos en pollos de carne al fin de determinar si los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 modifican la eficiencia de utilización de la energía metabolizable aparente (EMA) destinada a crecimiento (*kg*) en comparación con los ácidos grasos saturados (AGS). En el experimento 1 se utilizó el método de sacrificios comparados. A 1446 ± 6.4 g de peso y durante 21 días, 4 grupos de 8 pollos fueron alimentados *ad libitum* o restringidos con 2 piensos que contenían el 9 % de sebo (AGPI/AGS, 0.32; dieta T, 10.5 % de grasa bruta, EE) y el 9% de aceite de linaza (AGPI/AGS, 5.19; dieta LO; 10.4 % de EE). La energía retenida (ER) en el animal fue menor en LO ($P \leq 0.05$) en comparación con T (345 vs. 457 kJ/ave/día, $P = 0.007$), y en paralelo a la menor cantidad de ER en forma de grasa (255 vs. 369 kJ/100g de incremento de peso vivo; $P = 0.067$). Estas diferencias no fueron debidas al nivel de alimentación. La *kg*, calculada como la pendiente de la regresión lineal entre la energía metabolizable aparente ingerida (AMEI) y la ER, no fue diferente entre piensos, aunque la ordenada en origen fue mayor para los animales alimentados con sebo, lo que indica una mayor deposición de grasa independientemente de la cantidad de AMEI. En el experimento 2, se realizaron mediciones de intercambio gaseoso. Tres grupos de 8 aves fueron alimentadas *ad libitum* o restringidas con un pienso control (C: 2.6 % de EE), con un pienso con el 9 % de sebo (dieta T, 11.1 % de EE) o el 9 % de aceite de linaza (dieta LO, 11.0 % de EE). Entre los días 39 y 52 de edad, se midió la producción de calor (PC) de cada grupo de aves, dos veces por cada nivel de alimentación, mediante cámaras respirométricas durante 24 horas. Los pollos alimentados con LO presentaron menor grasa abdominal en comparación con los que consumieron T (32 vs 25 g; $P = 0.005$). Sin embargo, la PC no fue diferente entre dietas. Los resultados de estos experimentos indican que los AGPI n-3 en comparación con los AGS reducen la ER tanto en situaciones de alimentación *ad libitum* como restringida. Además no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las eficiencias de utilización de la energía metabolizable aparente destinada a crecimiento (*kg*) de las grasas. A la vista de los resultados, las necesidades de mantenimiento podrían ser mayores cuando se alimentan las aves con raciones ricas en AGPI n-3 comparados con las alimentadas con AGS. El efecto de los AGPI n-3 sobre la deposición de grasa es una herramienta que permite modular la formación de los depósitos lipídicos en el pollo de carne y es interesante de cara a futuros estudios en mamíferos.

Palabras clave: pollos de carne, grasa de la ración, partición de la energía

6.3. Introduction

Ad libitum consumption of high energy content diets is necessary for optimal growth of broiler chickens in intensive production. Thus, fats and oils are important ingredients to achieve the dietary required energy concentration. Previous reports indicate that dietary fat amount and profile of fatty acid (FA) affect the lipid composition of chicken body tissues (Sanz et al., 1999; Crespo and Esteve-Garcia, 2001) and have a great importance on nutritional, organoleptic, and commercial characteristics of produced meat.

As dietary fat increases, the deposited fat resembles more the composition of dietary fat (Ferrini et al., 2008). Moreover, the inclusion of oils rich in n-6 and n-3 PUFA in the diet induce lower body fat and RE than in chickens fed diets rich in SFA (Clarke 2000; Newman et al., 2002). This difference has been related to a different metabolic use of different fats (Sanz et al., 2000) in chickens and changes in the basal metabolism and thermogenesis have been proposed in rats and humans (Valencak and Ruf, 2007).

The balance among the ingested and excreted energy plus HP determines the amount of RE as lean or fat tissue. The HP can be determined indirectly using the comparative slaughter method by difference between AMEI and RE. Changes induced in the thermogenesis by PUFA's have been reported by this method (Rigoni et al. 2001). However, calorimetry methods can be also used for HP measurements and no experiment has shown, by calorimetry, that n-3 PUFA consumption increases HP of the bird or other species. On the other hand, all the experiments carried out in the past to study the effects of n-3 PUFA have used animals close to *ad libitum* conditions. However, no comparison of the efficiency of utilization including dietary restricted animals has been carried out.

Consequently, the objective of this study was to determine in broiler chickens whether the metabolizable energy from a diet containing n-3 unsaturated fat is used with a lower efficiency than that including an equal percentage of saturated fat. In order to evaluate the efficiency of utilization of AME of these fats two experiments were designed, one using the comparative slaughter method and the second one following the indirect calorimetric approach.

6.4. Material and methods

Experiments 1 and 2 were carried out in the facilities of the Veterinary School of the Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain) and in the Estación Experimental del Zaidín of Centro Superior de Investigaciones Científicas (Granada, Spain), respectively. Both experimental procedures received the approval of the respective Bioethical Committees following the European Union Guidelines (The Council of the European Communities, 1986).

6.4.1. Animals, diets and experimental design

Experiment 1. This experiment was carried out to assess the effect of different dietary fat saturation degrees on RE by the comparative slaughter method at two feeding levels (*ad libitum* or restricted).

Forty 1-d-old female broiler chickens Ross 308 strain were fed *ad libitum* a pre-experimental diet without added fat. At 1446 ±6.4g of weight the birds were randomly separated into five groups (8 birds per group). One group was immediately slaughtered with CO₂ at the beginning of the experimental period to determine the initial body composition. The remaining 32 chickens were placed in individual metabolic cages and fed *ad libitum* or restricted two diets containing 9 % of tallow (PUFA/SFA, 0.32; diet T, 10.5 % of EE) or 9 % of linseed oil (PUFA/SFA, 5.19; diet LO, 10.4 % of EE). The diets were formulated according to NRC requirements (1994). Tallow and linseed oil were obtained from Cailá-Parés, S.A. (Barcelona, Spain).

The restrictions of the voluntary feed intake were daily calculated, so that the daily AMEI was set 20% above maintenance (De Groote, 2000). The feed was daily supplied in one meal. The experimental feeding period was 21 days, and body weight and feed intake were monitored daily in order to determine the average daily intake, average daily gain and feed to gain ratio. Feed samples were taken during the experiment for proximate analysis (AOAC, 2000). The total excreta were collected and weighed, and a representative proportional sample was taken from each chicken three times per week. The cumulative samples from each bird were mixed, homogenized and an overall sample of 100 g was taken. The excreta samples were freeze-dried, reground and kept at -20 °C until their analysis. A light/dark period cycle of 23:1 h and a room temperature

of 22-26 °C were maintained throughout the experimental period.

At the end of the experimental period, the chickens were fasted for six hours, slaughtered with CO₂ and cut with a blade cutter and homogenized during 5 minutes. A representative sample of each animal was freeze-dried, reground and kept at -20 °C until analysis.

Experiment 2. This second experiment was carried out to assess the effect of saturated or polyunsaturated dietary fats on respiratory quotient (RQ) and HP at two levels of feeding (*ad libitum* or restricted).

Twenty-four 8-d-old female broiler chickens of the Ross 308 strain were placed in individual metabolic cages and, based on live weight, assigned to one of three treatment groups (8 chickens per treatment). Birds were fed *ad libitum* a control diet based on corn and soybean meal (diet C: without additional fat; 2.6 % of EE) or each of two diets containing 9 % of tallow (diet T, 11.1 % of EE) or 9 % of linseed oil (diet LO, 11.0 % of EE). The diets were formulated according to NRC requirements (1994). A light/dark period cycle of 23:1 h and a room temperature of 23-28 °C were maintained throughout the experimental period.

The AME content of the experimental diets was measured by total excreta collection according to the European reference method (Bourdillon et al., 1990) between d 25 and 27 d of age (8 birds per treatment). Total individual excreta were collected and weights were registered. Once the excreta were homogenized, they were frozen at -20 °C, lyophilized (Alpha I-6, Christ®, 336 Osterode/Halz) and stored for analysis. Feed samples were taken during the experiment for Weende analysis (AOAC, 2000).

Between days 39 and 52 of age the O₂ consumption and the CO₂ production of each treatment group was measured twice at two feeding levels (*ad libitum* and restricted). For this purpose, chickens were randomly assigned to one of two sub-groups of 4 chickens within each treatment group and each group was placed in one of two confinement respiration chambers (Lachica et al., 1995) at 25 °C (Figure 1). First, 24h gas-exchange measurements of sub-groups of chickens fed *ad libitum* were performed and their individual consumptions registered. Then, the same birds were fed restrictively to 50 % of the voluntary feed intake, so that their daily energy intake attained slightly

above their maintenance level (De Groot, 2000). The feed was supplied in one meal for each group, and after 48 h adaptation to the feeding level imposed a series of 24 h gas-exchange measurements were carried out at this level of feed restriction. Two respiration chambers were available and it was decided to carry out the two runs within feeding level and dietary treatment by measuring simultaneously treatments T and LO while the two sub-groups of four birds on treatment C were measured at the same time by placing each group in one chamber. Twenty-four gas-exchange measurements were made (4 per each type of fat and feeding level).

At the end of this period all chickens were re-fed *ad libitum* until d 55 of age and slaughtered by electrical stunning. The abdominal fat pad (AF; from the proventriculus surrounding the gizzard down to the cloaca) was removed from the hot carcass, and weighed. The AF weight was used as an estimator of the fattening index of the birds and expressed as percentage of final body weight.

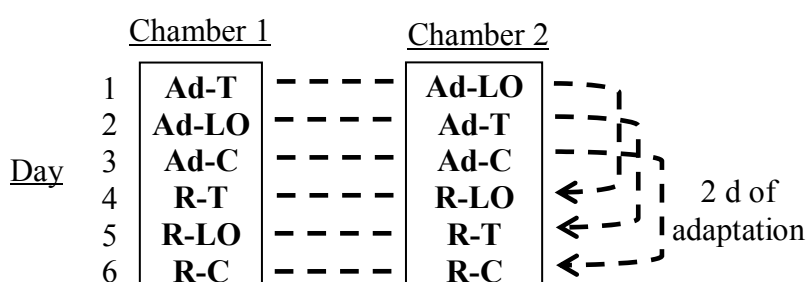


FIGURE 6.1. Between days 39 and 52 of age heat production of each treatment group was measured twice at two levels of feeding (one meal) after 2 days of adaptation, by placing 4 chickens in each of two confinement respirometry chambers for 24 hours. The abbreviations represent: Ad: *ad libitum*; R: restricted; T: 9% of added tallow; LO: 9% of added linseed oil; C: without added fat.

6.4.2. Analytical determination

The experimental diets were analyzed following the methodologies described by AOAC (2000) for dry matter (934.01), ash (942.05), nitrogen content (984.13), crude protein ($N \times 6.25$), crude fiber (962.09) and crude fat (920.39).

The FA content of experimental diets was quantified by gas chromatography as described by Sukhija and Palmquist (1998). The FA of whole body was determined by Carrapiso et al. (2000). In both cases, the FA techniques used consist of a direct

transesterification: lipid extraction and FA methylation are achieved in only one step as previously described by Cortinas et al. (2004). The sum of total FA of each sample was used as an estimator of the total amount of fat (g of fat per kg of analyzed feed) according to Villaverde et al. (2005).

Gross energy (GE) of feed, whole body and excreta was determined using an adiabatic calorimetric bomb (IKA Calorimeter C4000 Adiabatic; JankeKunkel, Staufen, Germany).

6.4.3. Calculations

The percentage of AME (% AME) of the diets of both experiments was calculated as:

$$\% \text{ AME} = [(\text{GE intake} - \text{GE excretion}) / \text{GE intake}] \times 100$$

The total AMEI was calculated as: $\text{AMEI, kJ} = (\% \text{ AME}/100) \times \text{GE, kJ/kg feed} \times \text{feed intake, kg}$. Energy retention (ER) in the body was calculated by the difference between final body energy content at the end of the 21-day feeding period and the initial energy content. Energy content was calculated from the energy content of the body and its weight (mean body weight \times energy content). Both AMEI and ER were expressed as a function of the metabolizable weight of the animal.

Energy stored in the body in the form of protein and fat were estimated assuming 23.60 kJ/g of protein and 39.29 kJ/g of fat retained during the 21-day feeding period, respectively. Both values were expressed in kJ/100 g of weight gain.

In Experiment 2, the RQ was calculated as the ratio between CO₂ production and O₂ consumption, both expressed in litres. The total amount of energy that was lost as heat production (HP) was calculated from data according to the short formula of Romijn and Lokhorst (1961): $\text{HP (kJ/h)} = 16.18 \text{ O}_2 \text{ (L/h)} + 5.02 \text{ CO}_2 \text{ (L/h)}$. The third term for urinary N excretion was omitted because it typically induce an error of <1%. Average values (kJ/bird) for AMEI and HP were calculated for each sub-group of 4 birds, extrapolated to 24h and expressed per kg metabolic body-weight (kJ/kg^{0.75}/day).

In Experiment 1, the net efficiency of utilization of AME for growth (*kg*) was calculated as the slope of the linear regression of RE on AMEI. The intercept on the X-axis of this

equation represents the maintenance energy requirement (ME_m) (Sakomura et al., 2005). In experiment 2, *kg* was calculated as 1 minus the slope of the linear regression of HP on AMEI.

6.4.4. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out through general linear model (GLM) procedure of SAS for Windows version 9.1 (SAS Inst., Inc., Cary, NC). The type of fat, feeding level, and the interaction were the factors included in the model for experiment 1. For this experiment, the experimental unit was the animal ($n = 8$ birds per treatment). For experiment 2, the experimental unit for the gas-exchanges and AMEI data was the group, while for final body weight and abdominal fat weight the experimental unit was the animal (8 birds per treatment). The type of fat, feeding level, and the interaction were the factors included in the model. The mean values were compared using Tukey's correction. In both experiments, α level of significance was 0.05.

6.5. Results

The composition of diets used in experiments 1 and 2 are presented in Table 6.1 and Table 6.2, respectively.

In both experiments the main differences observed were in their dietary profile of fatty acids. Diets with added tallow were enriched in SFA, while diets with added linseed oil were enriched in PUFA. PUFA/SFA ratio was higher in LO diets compared to T diets (T: 0.32 vs. LO: 5.19 and T: 0.38 vs. LO: 4.71 for experiments 1 and 2 respectively). The AME content of diet C in experiment 2 (13.2 MJ/kg) was lower compared to the diets containing 9 % of added fat. This diet, lower in fat but richer in carbohydrates compared to diets rich in PUFA or SFA, was considered in experiment 2 as a negative control. The AME content of T and LO were similar in both experiments (T: 14.44 vs. LO: 14.24 and T: 14.35 vs. LO: 14.75 MJ/kg of feed in experiments 1 and 2, respectively). The energy/protein ratio was similar in all experimental diets.

In experiment 1, the average final body weight, average feed intake, average daily gain was higher and feed to gain ratio was lower for chickens fed *ad libitum* than for chickens fed restricted (Table 6.3). No significant effect of the type of dietary fat was found on performance parameters.

Table 6.1. Ingredient, nutrient and major fatty acid composition of the broiler chickens diets¹ used in Experiment 1

Ingredient, g/kg of feed	Treatments ²		Nutrient composition	Treatments	
	T	LO		T	LO
			Dry matter, %	92.0	91.9
HP300® ³	320	320	Ash	12.4	16.1
Maize	300	300	Ether extract	10.5	10.4
Starch	175	131	Crude protein	21.4	21.8
Tallow	90.0	-	Crude fiber	2.35	2.22
Linseed oil	-	90.0	Gross energy, MJ/kg	17.10	16.70
Exal® ⁴	65.0	109	AME calculated ⁵	12.70	12.70
Calcium Carbonate	13.0	13.0	AME analyzed	14.44	14.24
Dicalcium phosphate	20.0	20.0			
Salt	5.00	5.00	Total FA ⁶ , g/kg	96.7	97.2
Coline -CI	0.015	0.015	SFA	45.3	12.1
DL-Methionine (99%)	1.985	1.985	MUFA	37.0	22.8
Vitamin and mineral premix ⁴	10.0	10.0	PUFA	14.5	62.9
			PUFA/SFA	0.32	5.19

¹Analytical values are means of 3 determinations. ²T: Tallow; LO= linseed oil. ³Hydrolyzed soy protein (Andersen S.A., Barcelona. Spain). ⁴ Sepiolite (Tolsa S.A., Madrid. Spain). ⁴ Provided per kg of diet: vitamin A: 12,000 IU; vitamin D3: 2,400 IU; vitamin E: 30 mg; vitamin K₃: 3 mg; vitamin B₁: 2.2 mg; vitamin B₂: 8 mg; vitamin B₆: 5 mg; vitamin B₁₂: 11 µg; folic acid: 1.5 mg; biotin: 150 µg; calcium pantothenate: 25 mg; nicotinic acid: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Ethoxyquin: 150 mg. ⁵ Assuming 29.288 and 37.656 MJ/kg of ME for tallow fat and linseed oil, respectively. ⁶ SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

Table 6.2. Ingredient, nutrient and major fatty acid composition of the broiler chickens diets¹ used in Experiment 2

Ingredient, g/kg of feed	Treatments ²			Nutrient composition	Treatments		
	C	T	LO		C	T	LO
				Dry matter, %	88.5	89.2	89.4
Maize	530	530	530	Ash	5.69	5.80	6.64
Soybean 47	330	330	330	Ether extract	2.60	11.1	11.0
Starch	90.0	-	-	Crude protein	19.8	19.9	20.3
Tallow	-	90.0	-	Crude fiber	2.52	2.74	2.27
Linseed oil	-	-	90.0	Gross energy, MJ/kg	18.20	20.34	20.16
Calcium Carbonate	14.0	14.0	14.0	AME calculated ⁴	12.06	13.17	13.92
Dicalcium phosphate	20.0	20.0	20.0	AME analyzed	13.20	14.35	14.75
Salt	4.00	4.00	4.00				
L-Threonine	2.00	2.00	2.00	Total FA ⁵ , g/kg	31.0	103	108
DL-Methionine (99%)	2.00	2.00	2.00	SFA	8.00	46.3	14.6
L-Lysine	4.00	4.00	4.00	MUFA	7.10	38.7	24.8
Vitamin and mineral premix ³	4.00	4.00	4.00	PUFA	15.9	17.5	68.7
				PUFA/SFA	1.98	0.38	4.71

¹ Analytical values are means of 3 determinations. ² T: Tallow; LO= linseed oil. ³ Provided per kg of diet: vitamin A: 12,000 IU; vitamin D3: 2,400 IU; vitamin E: 30 mg; vitamin K₃: 3 mg; vitamin B₁: 2.2 mg; vitamin B₂: 8 mg; vitamin B₆: 5 mg; vitamin B₁₂: 11 µg; folic acid: 1.5 mg; biotin: 150 µg; calcium pantothenate: 25 mg; nicotinic acid: 65 mg; Mn: 60 mg; Zn: 40 mg; I: 0.33 mg; Fe: 80 mg; Cu: 8 mg; Se: 0.15 mg; Ethoxyquin: 150 mg. ⁴ Assuming 33.472 MJ/kg of ME for tallow fat and linseed oil. ⁵ SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

Table 6.3. Experiment 1. Effect of the amount and type of dietary fat and feeding level on the performance of broiler chickens (n=8)¹

Item ²	Final body weight <i>G</i>			Average feed intake <i>g/bird/d</i>			Average daily gain <i>g/bird/d</i>			Feed to gain ratio		
	T	LO	Mean	T	LO	Mean	T	LO	Mean	T	LO	Mean
Restricted	2033	2037	2035 ^b	80.2	79.4	79.8 ^b	28.3	28.3	28.3 ^b	2.89	2.83	2.85 ^a
<i>Ad libitum</i>	2736	2618	2677 ^a	133	128	130 ^a	61.3	55.9	58.6 ^a	2.18	2.31	2.24 ^b
Mean	2384	2328		107	104		44.8	42.1		2.52	2.57	
Pooled SD	148.6			13.04			7.36			0.224		
Type of fat	0.285			0.520			0.302			0.529		
Feeding level	<.0001			<.0001			<.0001			<.0001		
Interaction	0.255			0.630			0.299			0.3413		

¹The feeding period lasted 21 days. ^{a-b} Values in the same column with no common superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$). ² T = diet with 9% of added tallow; LO = diet with 9% of added linseed oil.

The results of the 21-day energy balance are shown in Table 6.4. The AMEI and RE were calculated as per kg of mean metabolizable weight (MMW) during the 21 days period. The AMEI was not affected by PUFA or SFA consumption. Both experimental factors affected significantly RE. The retained energy in the body of chickens was higher when PUFA/SFA ratio in the diet was lower (255.5 vs. 207 kJ/kg^{0.75}/day, for diets T and LO respectively; $P = 0.047$). Data of AMEI and RE was also calculated as kJ/bird/day and the results obtained were equal. The amount of energy retained as protein was not affected by the treatment. However, retained energy as fat tended to increase in birds fed T diet (369 vs. 255 kJ/100g of weight gain for diets T and LO, respectively; $P = 0.067$).

Table 6.4. Experiment 1. Effect of the amount and type of dietary fat and feeding level on the energy balance of broiler chickens (n=8)¹

Item ²	AMEI ³ kJ/ MMW /d			RE ³ kJ/ MMW /d			RE as protein ⁴ kJ/100 g of weigh gain			RE as fat ⁴ kJ/100 g of weigh gain		
	T	LO	Mean	T	LO	Mean	T	LO	Mean	T	LO	Mean
Restricted	699	699	699 ^b	132.9	141.0	113.0 ^b	585	550	568 ^a	130	-44	43 ^b
<i>Ad libitum</i>	1002	977	990 ^a	378.1	548.2	349.9 ^a	463	479	485 ^b	625	501	563 ^a
Mean	850	838		255.5 ^a	207.5 ^b		524	515		377 ^a	229 ^b	
Pooled SD	73.2			119.38			53.3			166.0		
Type of fat	0.648			0.047			0.369			0.014		
Feeding level	<.0001			<.0001			<.0001			<.0001		
Interaction	0.643			0.721			0.207			0.267		

¹The feeding period lasted 21 days. ^{a-b} Values in the same column or row with no common superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$). ² T = diet with 9% of added tallow; LO = diet with 9% of added linseed oil. ³ AMEI = apparent metabolizable energy intake calculated per kg of mean metabolizable weight (MMW); RE = retained energy. ⁴ RE estimated assuming 23.60 and 39.29 kJ/g of protein and fat deposited, respectively.

Linear regression equations relating RE and AMEI were calculated for each fat source and compared. Slope was not significantly different between the two fat sources (0.786 ± 0.0416 , $P = 0.009$) but intercept was higher for animals fed diet including LO compared to those fed T (-453.8 ± 30.20 vs. -415.5 ± 36.52 , respectively) ($r^2 = 0.95$; $P < 0.001$). Thus efficiency of utilization of ME for growth (kg) was not different between diets. However, from this equations EMM was higher for animals fed the LO diet compared to animals fed T diet ($577.4 \text{ kJ/kg}^{0.75}/d$ vs. $528.7 \text{ kJ/kg}^{0.75}/d$, respectively).

Data related to body weight and abdominal fat of chickens in experiment 2 are shown in Table 6.5. Birds fed diet C tended to have lower final body weight than those fed diets with 9 % of added fat. No differences in body weight were found between chickens on diets T and LO. The abdominal fat was lower in chickens fed diet C compared to chickens on diets enriched in fat. Moreover, birds fed diets rich in PUFA showed lower abdominal fat weight than those chickens fed diets rich in SFA both in absolute (g) and relative basis (g/100 g of body weight).

Table 6.5. Experiment 2. Effect the amount and type of dietary fatty acid on final body weight and abdominal fat weight of broiler chickens (n=8)¹

Item ²	C	T	LO	Pooled SD	P value
Final body weight, g	2461	2565	2546	165	0.239
Abdominal fat, g	17.9 ^c	32.0 ^a	25.7 ^b	5.60	0.005
Abdominal fat, %	0.73 ^c	1.26 ^a	1.01 ^b	0.209	0.004

¹At 55 days of age. ^{a-c} Value in the same row with no common superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$). ² C: without additional fat; T = diet with 9% of added tallow; LO = diet with 9% of added linseed oil.

The higher RQ was observed in birds fed *ad libitum* compared to the chickens fed restricted (Table 6.6; 0.904 vs. 0.802 ; $P < 0.001$). As expected, the chickens consuming the diet low in fat (C) showed higher RQ compared to those on the fat-enriched diets ($P = 0.008$ and $P = 0.004$ for C vs. T and LO respectively). Regarding the type of dietary fat, no difference between the T and LO treatments was found.

Values observed for AMEI and HP according to dietary fatty acid profile and level of feeding are shown in Table 6.7. Chickens on C treatment showed the lowest AMEI at both feeding levels. The type of fat incorporated to the diet did not alter AMEI. Only level of feeding affected HP. Given that HP showed no differences between fat sources, no comparison of slopes was carried out.

Table 6.6. Experiment 2. Effect of the amount and type of dietary fat on the respiratory quotient (RQ) in broiler chickens¹

Item ²	RQ			Mean value
	C	T	LO	
Restricted	0.836	0.788	0.782	0.802 ^b
<i>Ad libitum</i>	0.928	0.896	0.888	0.904 ^a
Mean value	0.882 ^a	0.842 ^b	0.835 ^b	
Pooled SD	0.038			
Type of fat	0.003			
Feeding level	<.0001			
Interaction	0.579			

¹Gas exchange measurements took place between 39 and 52 days of age on two sub-groups of 4 chickens each per dietary treatment. ^{a-b} Values in the same column or row with no common superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$). ²C: without additional fat; T = diet with 9% of added tallow; LO = diet with 9% of added linseed oil.

Table 6.7. Effect of the amount and type of dietary fat on the intake of apparent metabolizable energy (AMEI, kJ/kg^{0.75}/d) and heat production (HP, kJ/kg^{0.75}/d) of broiler chickens (n=4). Experiment 2

Item ²	AMEI				HP ¹			
	C	T	LO	Mean value	C	T	LO	Mean value
Restricted	525	604	582	570 ^b	240	267	269	258 ^b
<i>Ad libitum</i>	1044	1220	1118	1127 ^a	437	425	421	428 ^a
Mean value	785 ^b	912 ^a	851 ^{ab}		338	346	345	
Pooled SD	47.5				28.9			
Type of fat	0.025				0.923			
Feeding level	<0.001				<0.001			
Interaction	0.373				0.520			

¹Gas exchange measurements took place between 39 and 52 days of age on two sub-groups of 4 chickens each per dietary treatment. ²C: without additional fat; T = diet with 9% of added tallow; LO = diet with 9% of added linseed oil.

6.6. Discussion

It is well established that saturated fat has lower AME than polyunsaturated oil and, however, SFA induce higher fat deposition and energy retention in broiler chickens compared to PUFA (Sanz et al., 1999; Crespo and Esteve-Garcia, 2001). We clearly observed this effect in the experiments presented in this manuscript.

In this study the amount of energy retained as protein was not affected by the source of fat. These results was in according to Ferrini et al. (Trabajo 2) who describes that the retained nitrogen decreases only when the level of dietary added fat increases but not by the type of fat included in the diet.

The balance between AMEI and energy expenditure determines body composition of the chicken (Hakasson and Svenson, 1984; Boekholt et al., 1994; Wiseman and Lewis, 1998). The AMEI was not affected by the type of fat included in the diet. Thus, the

observed reductions in fat deposition resulting from the consumption of unsaturated fats, in contrast to saturated ones, are likely to be differences in HP.

These differences have been related to changes in the energy metabolism and may be associated to different mechanisms that regulate lipid metabolism as lipoprotein transport, activity of key enzymes, or lipid oxidation, synthesis and storage. This effect is not totally well characterized and some effects are controversial; i.e. Sanz et al. (2000) reported that PUFA may inhibit hepatic lipogenesis and, on the contrary, Crespo and Esteve-Garcia (2002) observed a higher *in vivo* lipogenesis in broilers fed linseed oil. Other effects, as the increase of lipid oxidation by PUFA, seem to be more consistent across species and several studies suggest that PUFA increase metabolic rate, specifically causing a higher β -oxidation rate. These results are based on determinations of the activity of particular key enzymes such as glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, fatty acid synthase and, L-3-hydroxyacyl-Coa dehydrogenase on lipid metabolism (Sanz et al., 2000; Ferrini et al., 2005). Moreover, there is evidence that PUFA also have the ability to affect the expression of genes, encoding for enzymes involved in lipid metabolism and to interact with transcription factor, and nuclear receptor proteins that bind DNA (Hu et al., 1995; Didri et al., 2004).

Preferential oxidation of PUFA compared to SFA will reduce fatty acids available for deposition in chickens fed diets rich in PUFA and RE in these chickens will be lower as observed in the present study. Moreover, our results show that this difference appears also when the animal are under severe dietary restriction. This constitute a point of discussion in human nutrition, and some authors have proposed that the effect of n-3 FA reducing fat deposit only happen in people that consumes calories in excess or people that already present obesity. However, our data suggest that the effect of n-3 FA appears even under severe dietary restriction. In fact, it can be proposed that maintenance energy requirement is higher for chickens when fed n-3 FA. The regressions calculated with data from the T and LO treatments showed no difference in the slope but the intercepts were different for each regression. It implies that, in an extrapolation to maintenance, the maintenance energy requirements are different as calculated for those fed linseed oil. This observation is in concordance with the hypothesis that the basal metabolism of the animal is changed by n-3 fatty acids (Valencak and Ruf, 2006).

Sanz et al. (2000) showed that the effect of n-3 fatty acids disappeared when the

metabolizable energy density of the diet was reduced to 12.5 KJ/kg, maintaining the relation with protein. However, the inclusion level of n-3 FA in that experiment decreased to 3 % of the diet. It is possible that the effect of n-3 FA on energy metabolism only appears after a minimum level of inclusion in the diet and then it remains constant. This fact has been already observed for the effects of n-3 FA in the immune system (Korver and Klasing, 1997). In our experiment the level of inclusion was not modified in the diet for the *ad libitum* or of the restricted animals. Thus, in both situations, the energy from unsaturated fat might have been the same and preferentially used for processes other than lipogenesis. These results would well support the hypothesis that a greater part of the ME from the PUFA ingested was lost as heat, compared to the energy provided by dietary SFA. So, we expected to observe this difference in HP in experiment 2, however no differences were found. Newman failed also to show the difference in the RQ between animals fed SFA and PUFA, however, he showed a trend in RQ to be lower for animal fed PUFA compared to those fed SFA. We used a different design than the one used by Newman et al (2002). In particular, we used groups of chickens instead of individual chickens to decrease the variability. However the final variability was similar to that obtained by Newman et al.

The quantity of carcass fat is generally considered to be an unfavourable trait in the broiler industry, leading to feeding programs aimed at reducing or limiting carcass fat content. However, reducing energy in the diet is not an option because the broiler chicken needs high energy density diets to maintain his high growth rate. The inclusion of PUFA with a comparatively higher availability but lower efficiency of utilization for fat deposition than SFA could represent an important factor to regulate body fat content improving the currently used feeding programs for broiler production.

However, the data presented in this manuscript is also relevant to the general biology of n-3 FA. Chickens present important similarities with humans in lipid metabolism (Werner and Bergen, 2005). The results of this study indicate that the lower retention of energy and abdominal fat depots in the body of chickens fed n-3 FA is not affected by severe dietary restriction. These results suggest that maintenance energy requirements of the chicken could be increased when n-3 FAs are included in the diet. This hypothesis needs to be tested also in mammals because of the possible implications for n3-FA utilization in obesity control.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

7. Discusión general

En estudios previos a la presente Memoria de Tesis se muestra cómo a través de la modificación de la fracción grasa de la ración de pollos de carne, podemos alterar la composición lipídica de la grasa depositada en los diferentes tejidos. Alimentando a las aves con raciones suplementadas con altos niveles de grasa, los depósitos de grasa del animal proceden en mayor grado de la ración, y el perfil de ácidos grasos (AG) de sus tejidos es el reflejo del perfil de AG del pienso consumido. En relación al tipo de grasa añadida al pienso, está bien establecido que se produce una reducción de la cantidad de grasa depositada en las aves que consumen linaza (rica en AG poliinsaturados) comparado con las que consumen raciones con sebo (rico en AG saturados). Nuestros resultados confirman que, además de modificar el perfil en AG de los tejidos, los piensos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) reducen la deposición de grasa en el pollo de carne en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (Sanz et al., 1999, 2000; Crespo y Esteve-García 2001, 2002; Cortinas et al. 2004; Villaverde et al. 2006).

7.1. Trabajo 1 y 2.

Conforme aumenta el grado de insaturación entre diferentes tipos de grasa, a igual nivel de inclusión, los animales que consumen la ración más poliinsaturada registran una reducción del 30 % y del 9 % en el depósito de grasa abdominal y de la piel (incluida grasa subcutánea), respectivamente (Figura 7.1).

En la Figura 7.2 se puede observar como la cantidad de piel está correlacionada con la cantidad de grasa abdominal. Por cada 10 g más de depósito en forma de grasa abdominal el depósito de piel aumenta en 16,7 g. La piel, junto con la grasa abdominal, representa uno de los principales depósitos separables de grasa y puede llegar a constituir hasta un 15 % del peso total de la canal. No obstante, los resultados presentados en esta memoria demuestran que la reducción de peso a través de la modificación del perfil en AG de la ración en la piel no es tan marcada como la disminución obtenida en la grasa abdominal. Existe la hipótesis que la formación del depósito lipídico en pollos tiene lugar desde el interior al exterior del animal. Es decir, inicialmente los triglicéridos procedentes de la ración se depositan primero y

preferencialmente en el tejido adiposo abdominal y luego en la piel. Por tanto, cuando alimentamos las aves con grasa insaturada, el grado de reducción del depósito de grasa en la piel es menor respecto al de la grasa abdominal, fenómeno que se explicaría, en parte, por su localización.

Figura 7.1. Efecto del grado de insaturación de la ración sobre la cantidad de grasa abdominal y piel en pollos de carne (expresado en g por ave). Trabajo 1.

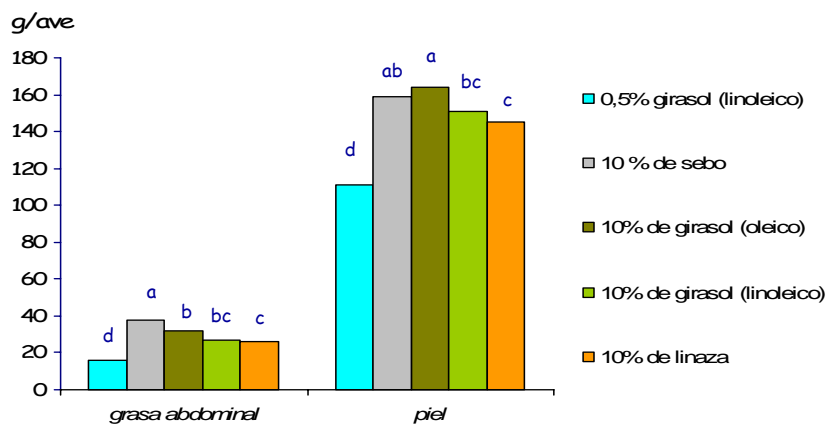
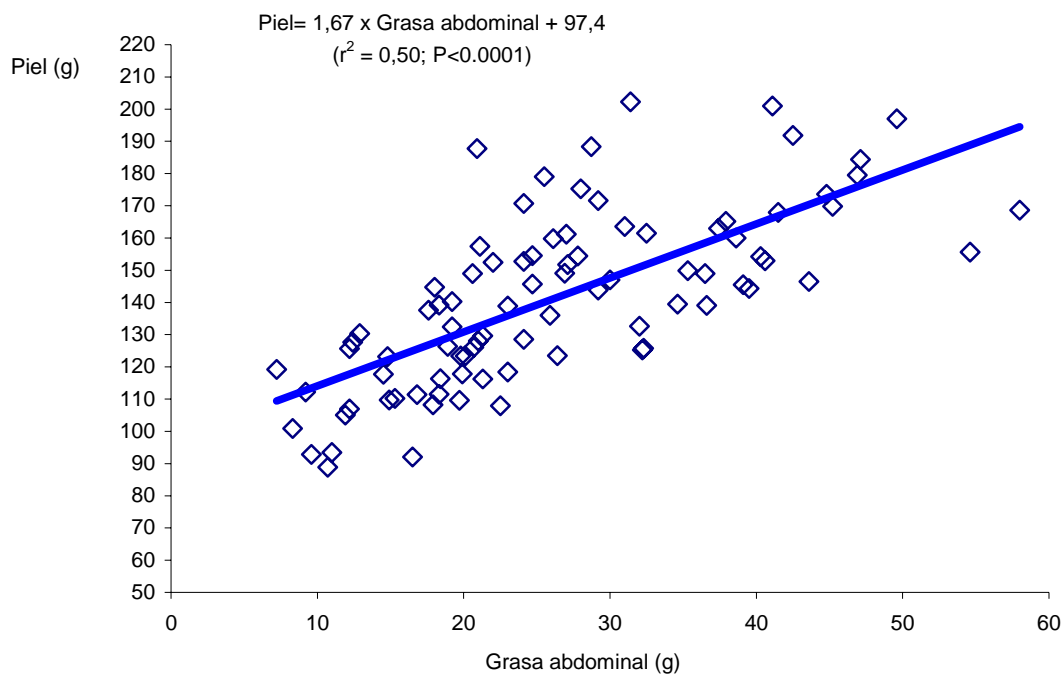
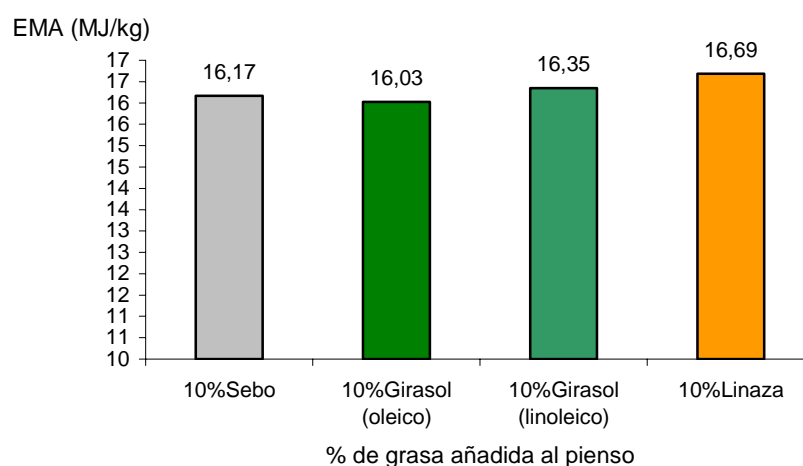


Figura 7.2. Cantidad de piel en el pollo en función de la grasa abdominal depositada, expresado en g. Trabajo 1.



Estos resultados son sorprendentes sobre todo si tenemos en cuenta los valores de energía metabolizable aparente (EMA) de la grasa añadida al pienso. Es bien conocido que los aceites vegetales más insaturados tienen mayor EMA que las grasas de origen animal más saturadas. Asimismo, podemos observar en la Figura 7.3 como el contenido en EMA de las raciones con diferente tipo de grasa, aumenta conforme aumenta el grado de insaturación de la grasa añadida. Por tanto, parece lógico pensar que a medida que sustituimos la grasa saturada por insaturada, manteniendo el mismo nivel de inclusión de grasa, el engrasamiento corporal de las aves se incrementa. Sin embargo, sucede todo lo contrario.

Figura 7.3. Energía metabolizable aparente determinada en los piensos con diferente tipo de grasa añadida al 10%. Trabajo 1.



En relación a los resultados del estudio 2 presentados en el capítulo 4 de la presente memoria de tesis, es interesante señalar que los piensos se formularon para ser isoenergéticos en EMA (Figura 7.4). Se tuvo en cuenta los diferentes valores de EMA de las grasas obtenidos en anteriores ensayos (asumiendo 29,288 y 37,656 MJ/kg para el sebo y linaza, respectivamente) y se compensó con el aporte de almidón.

Tal y como podemos observar en la Figura 7.5, el consumo de EMA fue similar entre los animales que consumieron sebo y linaza. Sin embargo, se presentaron diferencias en la energía retenida en el cuerpo en función del perfil en AG de la ración. Así las aves que consumieron raciones con linaza tuvieron una cantidad de energía retenida (ER) menor que las que consumieron sebo, estos datos parecen apuntar a una mayor eficiencia de utilización de la energía proveniente del sebo.

Figura 7.4. Energía metabolizable aparente determinada de los piensos experimentales. Trabajo 2.

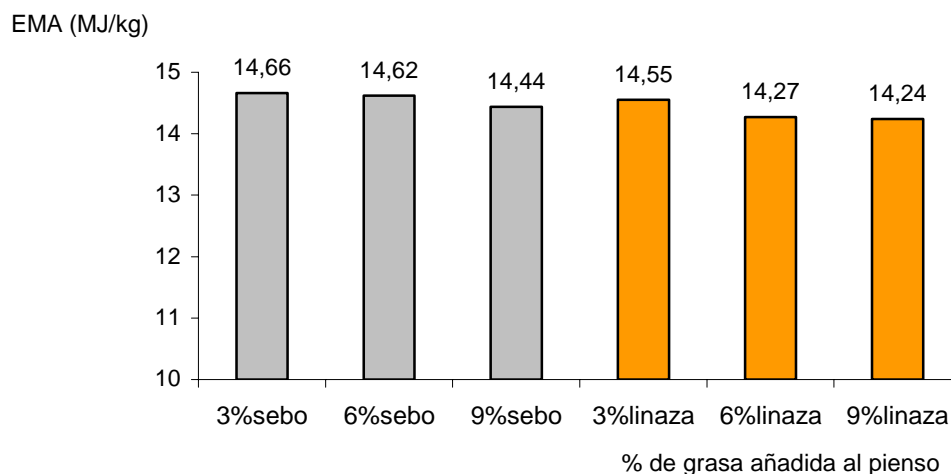
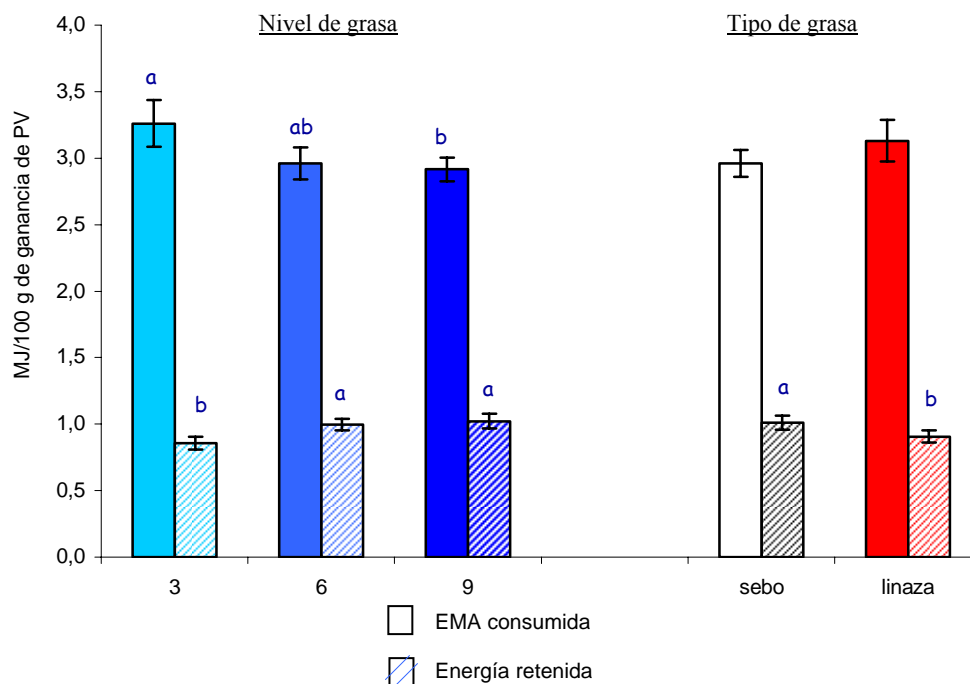


Figura 7.5. Energía metabolizable aparente consumida (barras lisas) y energía retenida (barra ralladas) según nivel y tipo de grasa añadida (MJ/ 100 g de ganancia de peso vivo). Trabajo 2. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre barras del mismo tipo para cada factor. Trabajo 2.

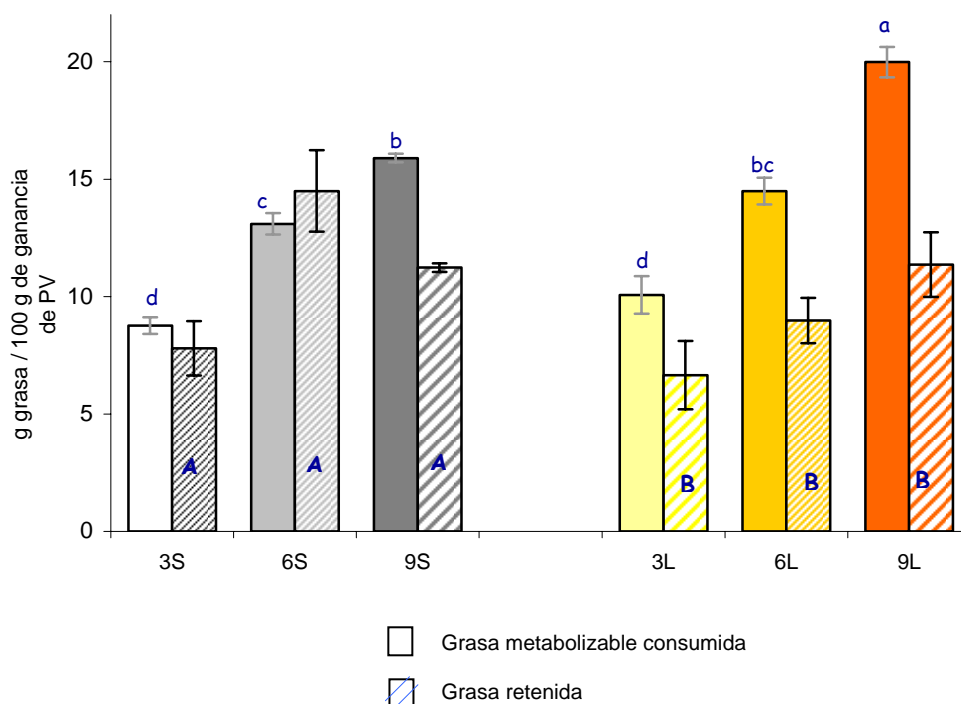


En relación al efecto del nivel de inclusión de grasa en la ración, podemos observar que conforme aumentamos el nivel de inclusión de grasa el consumo de energía disminuye debido principalmente al menor contenido en EMA de los piensos con mayor nivel de inclusión de grasa. El pollo, al disminuir el contenido en EMA de la ración aumenta la cantidad de pienso consumido pero no llega a alcanzar la EMA consumida por los pollos alimentados con las raciones más energéticas (capítulo 4, tabla 4.3). En relación

al resultado de ER por ganancia de peso podemos observar que conforme aumentamos el nivel de inclusión de grasa en el pienso aumenta la cantidad de ER, indicando una mayor eficiencia de utilización de la energía proveniente de la grasa de la dieta respecto a la energía proveniente de carbohidratos.

En la figura 7.6 podemos ver como, lógicamente, la cantidad de grasa metabolizable consumida por el animal aumenta conforme aumentamos el nivel de grasa de la ración. Como era de esperar, los animales alimentados con piensos con altos niveles de sebo presentan un menor consumo de grasa metabolizable que los que ingieren altos niveles de aceite de linaza. Pero es interesante destacar, que la retención de grasa en el cuerpo es superior con el consumo de grasas ricas en ácidos grasos saturados (AGS) que con grasas poliinsaturadas.

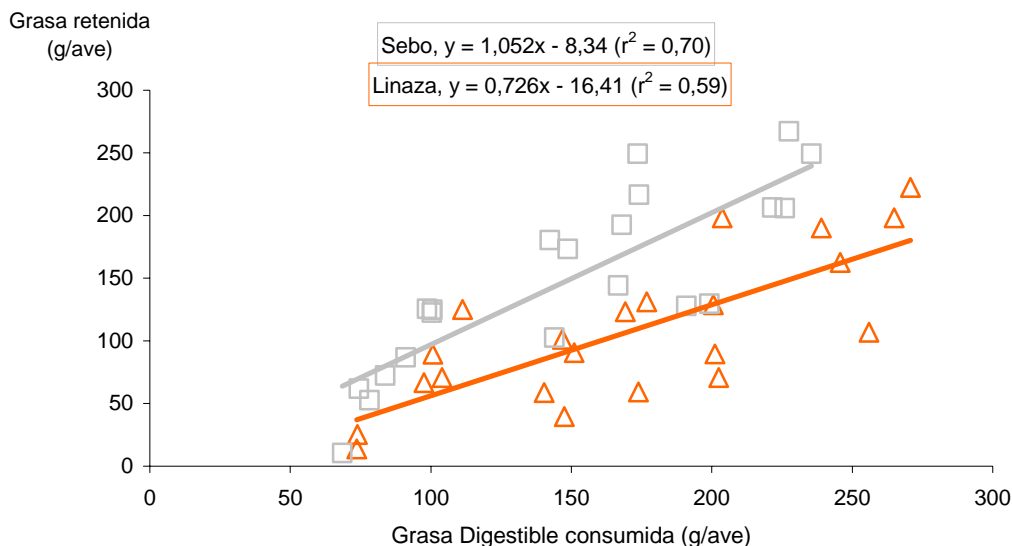
Figura 7.6. Efecto del tipo y del nivel de incorporación de grasa en la ración sobre el consumo de grasa metabolizable (barras lisas) y la grasa retenida (barras ralladas) expresado en g de grasa/100 g de ganancia de peso vivo. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre barras del mismo tipo. Trabajo 2.



Si observamos las ecuaciones calculadas (Figura 7.7), se deduce que el ritmo de incremento de grasa retenida en función de la grasa metabolizable consumida es superior en un pollo que recibe una ración con niveles crecientes de sebo en vez de grasas poliinsaturadas. Por cada 10 g más de grasa absorbida el incremento en grasa

retenida sería de 10,5 g si la fuente de grasa elegida es el sebo mientras que sería de 7,2 g si incluimos linaza, es decir el incremento en la retención de grasa se reduciría en un 32 %.

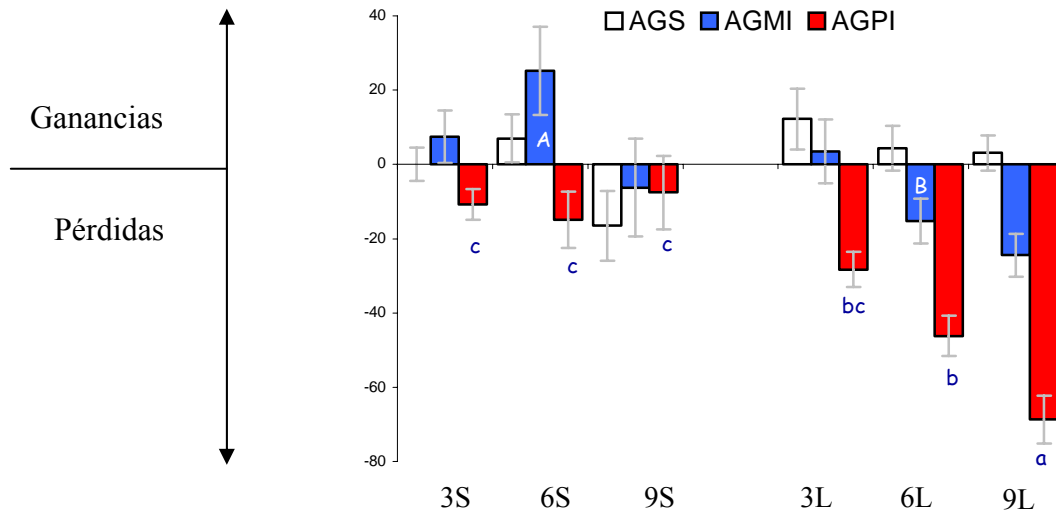
Figura 7.7. Grasa retenida en función de la grasa digestible ingerida (g/ave). Trabajo 2.



Tal y como se representa en la Figura 7.8, la principal reducción del depósito lipídico corporal se debe a la pérdida de AGPI. Es decir, al aumentar la insaturación de la grasa del pienso la pérdida de AG es mayor, y esta pérdida se debe fundamentalmente a los AGPI.

En este punto, la pregunta fundamental, es ¿Por qué se producen estas diferencias en la utilización de los AG? Existen diferentes hipótesis para explicar este fenómeno. Sanz et al. (2000) explicaron este hecho argumentando que las grasas poliinsaturadas n-6 provocan un aumento de la β -oxidación y/o una inhibición de la síntesis endógena. Por otro lado, otros autores han apuntado que el consumo de fuentes ricas en AGPI presentes en los aceites vegetales inhibe alguna vía metabólica responsable de la regulación del estado de engrasamiento de las aves (Pesti et al. 2002), mientras que Crespo y Esteve-García (2002) atribuyen esta reducción del depósito lipídico a una mayor pérdida de energía procedente de los AGPI que se destina a la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Figura 7.8. Ganancias o pérdidas (g/ ave) en ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Trabajo 2.



7.2. Trabajo 3, 4 y 5

Nuestros resultados obtenidos en muestras de sangre, grasa abdominal, hígado y corazón confirman algunas de las hipótesis previas y aclaran algunos aspectos del metabolismo lipídico relacionados con el uso de diferentes fuentes de grasa añadidas a la ración de pollos de carne.

Los datos relativos a la actividad de los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y de la enzima malico (EM), muestran que la actividad de lipogénesis *de novo* en el hígado no fue diferente entre sebo y linaza. Sin embargo, se observó un mayor depósito de grasa en los animales que consumían sebo. El depósito de grasa abdominal en las aves, está directamente relacionado con los lípidos circulantes que vienen de la lipogénesis hepática o de la ración. Por lo tanto nuestros resultados, tal y como ya describieron Sanz et al. (2000) para los AGPI n-6, sugieren una deposición directa de AGS consumidos; estos serán, preferentemente, almacenados en el tejido adiposo para ser movilizados y utilizados como fuente energética cuando sea necesario.

Por lo que se refiere a nuestros resultados de actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en grasa abdominal, el bajo consumo de grasa y/o energía, en contraste con una alta cantidad de grasa en el pienso causa una menor actividad LPL. La menor actividad LPL está relacionada con una menor entrada de AG procedentes de la ración en el tejido

adiposo y por lo tanto, se confirma que la LPL, en particular la LPL del tejido adiposo, juega un papel muy importante en la formación de los depósitos lipídicos corporales del pollo y que su actividad puede variar en función de la cantidad en AG y de la energía de la ración. Sin embargo, no se observaron cambios en la LPL debido a la composición lipídica de la dieta.

La utilización de AG como sustrato energético puede ser importante en tejidos como el hepático o el muscular. La β -oxidación de los AG a nivel mitocondrial, es el principal mecanismo de suministro energía para los tejidos, siendo limitante la etapa donde interviene la enzima L-3-hidroxi-acyl-CoA-deshidrogenase (L3HOAD) (Eaton et al., 2002). En relación a nuestros resultados, la actividad de L3HOAD en corazón, fue más alta en las aves que consumieron AGPI n-3 respecto a las que consumieron AGS o la dieta baja en grasa. En el trabajo de Sanz et al. (2000) se midió, además de la L3HOAD, la actividad de la carnitina palmitoil transferasa I (CPT I), enzima que facilita la entrada de los AG en las mitocondrias para su oxidación. En ambos casos, y de acuerdo con nuestros resultados, se encontraron mayores niveles de oxidación lipídica en pollos de carne alimentados con grasa poliinsaturada, respecto a los que consumieron sebo. Por lo tanto, cuando se suplementan los piensos con grasas ricas en AGPI, parece que estas se dirijan de forma preferencial hacia vías catabólicas, generando un gasto mayor de energía relacionado con un aumento de la β -oxidación. Esta bien establecido que los AGPI y varios de sus metabolitos actúan a nivel del núcleo celular, en conjunto con receptores nucleares tal y como los PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), LXR (liver X receptors) y HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α), y factores de transcripción como los SREBPs (sterol-regulatory element binding protein). Se ha demostrado que alteran la expresión génica de los genes precursores de enzimas de síntesis (FAS y ACC), enzimas de oxidación (CPTI) y de enzimas responsables del mantenimiento de la temperatura corporal (UCP; Sampath y Ntambi, 2005; Proszkowiec-Weglarz et al., 2009; Wang et al., 2009). Teniendo en cuenta las observaciones de estos autores y a la vista de nuestros resultados, podemos argumentar que la menor eficiencia de utilización de la energía asociada al consumo de AGPI observada en nuestros estudios podría estar relacionada con una modificación de la expresión de factores de regulación de enzimas implicados en el metabolismo lipídico.

Resulta de especial interés el aumento de la hormona tiroidea T3 circulante registrado

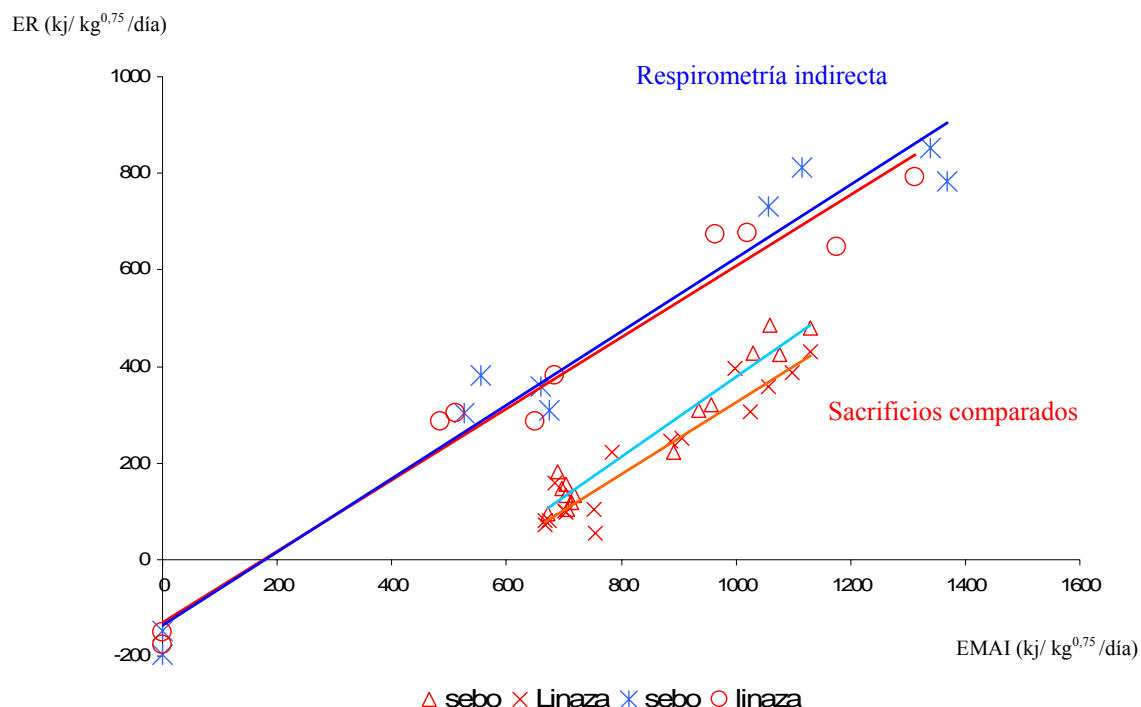
en las aves que consumieron linaza en el trabajo 3. Esta hormona ha sido relacionada con la expresión de UCP (proteínas desacopladoras). Las UCP determinan la eficiencia de los procesos metabólicos de síntesis de ATP en el organismo y en concreto las UCP de pollo (avUCP) de pollo participan activamente en la termogénesis (Evoock et al., 2002; Collin et al., 2003, 2005, 2009; Abe et al, 2006). Estudios dirigidos a valorar la relación entre las hormonas tiroideas y la expresión génica de las UCP en tejido muscular de rata, muestran como una simple inyección de T3 induce un incremento de la expresión de UCP, una menor eficiencia respiratoria mitocondrial, y por tanto una menor eficiencia de utilización de la energía (Lanni et al., 1999, 2003; Jucker et al. 2000). Resultados similares se han encontrado en humano y cerdos (Cunningham et al., 2003; Katsumata et al., 2004), donde la T3 actúa directamente sobre la regulación de la expresión de la UCP2 y UCP3 en músculo esquelético y tejido adiposo dando lugar a una menor eficiencia energética.

En este punto nos encontramos con animales alimentados con AGPI n-3 que presentan un consumo similar de EMA pero una ER mucho menor que los animales alimentados con AGS. La pregunta lógica que nace de estos resultados es a que se dedica la energía no retenida y que sentido biológico puede tener esta ineficiencia. Los trabajos 4 y 5 estaban encaminados a determinar si los AGPI n-3 modifican la eficiencia de utilización de la EMA destinada a crecimiento (*kg*) en comparación con los AGS, o por el contrario existe un cambio en el metabolismo basal, y por tanto en la energía de mantenimiento del animal.

En los resultados del balance energético realizado por la técnica sacrificios comparados la EMA consumida fue similar para los animales independientemente de que consumieran grasa saturada o poliinsaturada (trabajo 4). Sin embargo, la incorporación de grasa poliinsaturada en la ración (linaza) da lugar a una menor cantidad de ER en comparación con la inclusión de materias grasas ricas en AGS (sebo), independientemente del nivel de alimentación (*ad libitum* vs. restringidos). Estos resultados son similares a los resultados obtenidos en el trabajo experimental 2, en el que la linaza es responsable de la menor ER en el cuerpo del animal independientemente del nivel de inclusión de grasa (3, 6 y 9 % de inclusión en la ración).

La eficiencia de utilización de la EMA destinada a crecimiento (*kg*), calculada en el experimento 4 (Figura 7.9) no fue diferente entre tipos de grasa. Sin embargo, la ordenada en origen fue mayor para los animales alimentados con sebo, lo que indica una mayor deposición de grasa independientemente de la cantidad de EMA consumida. Las ecuaciones obtenidas indicarían que una mayor proporción de la EMA es empleada en el mantenimiento del organismo de animales alimentados con AGPI n-3 comparados con animales alimentados con AGS. En este sentido la menor ER en el animal que ingiere raciones poliinsaturadas debería ir unida a una mayor producción de calor (PC).

Figura 7.9. Energía retenida (ER) en función de energía metabolizable aparente consumida (EMAI) expresados en $\text{kJ}/\text{kg}^{0.75}/\text{día}$. Trabajo 4 y 5.



El trabajo 5 (respirometría indirecta) fue diseñado para detectar estas diferencias en la PC. La *kg* calculada por este método fue muy similar a la obtenida por el método de sacrificios comparados, si bien la ER fue sobreestimada por las características del aparataje utilizado (Figura 7.9). Sin embargo, en este caso, no detectamos diferencias significativas en la ordenada de origen entre pollos de carne que consumieron raciones ricas en AGPI, comparados con los que consumieron raciones ricas en AGS. Es probable que un mayor número de unidades experimentales sea necesario para detectar este tipo de diferencias. Debido a que los experimento de respirometría requieren una

infraestructura muy compleja y precisa, este estudio se vio muy limitado en el número tanto de tratamientos como de repeticiones empleados (Tabla 7.1.).

Tabla 7.1. Ventajas e inconvenientes de las dos tipos de técnicas de alimentación empleada para valorar raciones con diferente tipo de grasa añadida en pollos de carne.

	Sacrificios comparados	Respirometría indirecta
Numero de tratamientos	Elevado	limitado
Numero de repeticiones	Elevado y a la misma edad	Limitado y a edades distintas
Cambio de plan de alimentación (de <i>ad libitum</i> a restringido, y viceversa)	No	si
Muestreo	Laborioso	rápido
Analítica	Laboriosa	rápida
Obtención de resultados (cálculos)	Laborioso	rápido

Estos trabajos contribuyen a desarrollar estrategias alimentarias basadas en la formulación de grasas que nos permitan modificar la cantidad de grasa depositada en la canal del pollo. Podemos reducir la cantidad de grasa de desecho de las canales, contribuyendo a una reducción de los residuos en las plantas de sacrificio y procesado.

A lo largo de este trabajo se intentó una aproximación a determinar el efecto de los AG de la dieta en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y energético, pero no fue posible la obtención de resultados concluyentes. Creemos que esta vía de estudio es el siguiente paso para continuar en avanzando en el efecto de la alimentación y en concreto del consumo de ácidos grasos sobre el metabolismo en general y el lipídico en particular.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en la presente Memoria de Tesis doctoral se puede extraer las siguientes conclusiones:

1. La ingestión de ácidos grasos poliinsaturados, en comparación a la de ácidos grasos saturados, da lugar a menor cantidad de piel en paralelo a un menor depósito de grasa abdominal en el pollo de carne (9 % vs. 30 % de reducción, respectivamente). En cuanto al perfil de AG, la composición lipídica de los piensos con grasa añadida se refleja de forma similar en ambos tejidos.
2. La cantidad de piel, incluida la grasa subcutánea, está correlacionada a la cantidad de grasa abdominal, independientemente del tipo de grasa añadida a la ración. Por cada 10 g más de depósito en forma de grasa abdominal el depósito de piel aumenta en 16.7 g.
3. A medida que se incrementa la cantidad de grasa absorbida, aumenta la cantidad de grasa depositada en el animal entero. Este incremento es menor (32 %) si la grasa añadida a la ración es linaza en lugar de sebo.
4. La cantidad de energía retenida en el animal entero es menor al incorporar en la ración una grasa rica en ácidos grasos poliinsaturados que una grasa saturada (sebo: 1009 vs. linaza: 906 kJ/100g PV). Esta menor energía retenida se debe a la menor retención de grasa, en concreto de ácidos grasos poliinsaturados.
5. La disminución simultánea del nivel de inclusión de grasa y de la concentración energética de la ración de pollos de carne disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en la grasa abdominal, lo que indica una menor entrada de ácidos grasos circulantes en comparación con los animales que consumen un pienso con altos niveles de grasa (10 %) y alto nivel energético.
6. La alimentación de pollos de carne con mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en comparación con ácidos grasos saturados, da lugar a una mayor actividad de L-3 hidroxilacil deshidrogenasa (L3HOAD), lo que indica

una mayor β -oxidación de ácidos grasos, posiblemente relacionada con la reducciones del deposito lipídico en estos animales.

7. El aumento de la hormona tiroidea T3 circulante está asociado al consumo de raciones ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-3. La mayor concentración de hormona T3 relacionada con un aumento de la tasa metabólica, podría ser, en parte, responsable del menor depósito de grasa observado en las aves que consumieron ácidos grasos poliinsaturados.
8. En nuestras condiciones de trabajo, el perfil en ácidos grasos de la ración no afecta a la producción de calor (PC) de pollos en crecimiento, y por tanto, la eficiencia de utilización de la energía metabolizable aparente (*kg*) no varía.
9. El menor deposito de grasa, y por tanto la menor energía retenida en las aves que ingieren raciones con grasa poliinsaturada está relacionado a un aumento de las necesidades en energía de mantenimiento comparado con los que consumen raciones ricas en ácidos grasos saturados.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referencias bibliográficas

Abe, T, Mujahid A, Sato K, Akiba Y, & Toyomizu M. (2006): Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Letters*. 580(20):4815-4822.

Aguilera JK, & Prieto C. (1985): An open circuit respiration unit for calorimetric studies with small animals. *Archives of Animal Nutrition*. 35(12): 825-833.

Aguilera JK, & Prieto C. (1986): Description and fuction of an open-circuit respiration plant for pigs and small ruminants and the techniques used to measure energy metabolism. *Archive Animal Nutrition*. 11:1009-1018.

Ajuyah AO, Lee KH, Hardin RT, & sim JS. (1991): Changes in the yield and in the fatty acids composition of whole carcass ans selected meat portions of broiler chickens fed full-fat oil seeds. *Poultry Science*. 70: 2304-2313.

Alvarez M, Diez JA, Lopez-Bote CJ, Gallego M, & Bautista JM. (2000): Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *British Journal of Nutrition*. 84:619-628.

AOAC, 2000: *Official methods of analysis of AOAC International*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, USA.

Asante EA, & Bufield G. (1988): Activities of NADPH-generating enzymes in genetically fat and lean chickens. In: Leanness in domestic birds. Leclercq B. & Whitehead C.C. (Eds) pp. 223-228. Butterworths, London.

Babson AL, Olson DR, Palmieri T, Ross AF, Becker DM, & Mulqueen PJ. (1991): The Immulite Assay Tube-a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clinical Chemistry*. 37:1521-1522.

Baillie RA, Takada R, Nakamura M, & Clarke SD. (1999): Coordinate induction of peroxisomal acyl-coa oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 60:351-356.

Beker WA, Spenser JV, Mirosh LW, & Verstrate JA. (1979): Prediction of fat and fat free live weight in broiler chickens using bakskin fat, abdominal fat, and live body weight. *Poultry Science*. 58:835-842.

Bensadoun A. (1991): Lipoprotein-Lipase. *Annual review of Nutrition*. 11:217-237.

Bergen WG & Mersmann HJ. (2005): Comparative aspects of lipid metabolism: Impact on contemporary research and use of animal models. *Journal of Nutrition*. 135:2499-2502.

Blanch A, Barroeta AC, Baucells MD, & Puchal F. (1995): The nutritive value of dietary fats in relation to their chemical composition. Apparent fat availability and metabolizable energy in two-week-old chicks. *Poultry Science*. 74:1335-1340.

Blanch A, Barroeta AC, Baucells MD, & Puchal F. (2000): Effect of the nutritive value of dietary fats in relation to their chemical composition on fatty acid profiles of abdominal and skin fat finishing chickens. *Archiv für Geflügelkunde*. 64:14-18.

Blaxter KL. (1962): The energy metabolism of ruminants. Hutchinson, London (Eds), pp 329.

Blaxter, KL. (1967): Techniques in energy metabolism studies and their limitations. *The Proceedings of Nutrition Society*. 26:86-96.

Boekholt HA, Van Der Grintin PH, Schreurs VVAM, Los MJN, & Leffering CP. (1994): Effect of dietary energy restrictions on retention on protein , fat and energy in broiler chickens. *British Poultry Science*. 35:603-14.

Borgström B. (1975): On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *Journal of Lipid Research*. 16 (6): 411-417.

Bourdillon A, Carre B, Conan L, Francesch M, Fuentes M, Huyghebaert G, Janssen WMMA, Leclercq B, Lessire M, McNab J, Rigoni M, & Wiseman J. (1990): European reference method for the in vivo determination of metabolizable energy in poultry: reproducibility, effect of age and comparison with predicted values. *British Poultry Science*. 31:567-576.

Brouwer E. (1965): Report of Sub-Comitee on constant and factors. In: Proc. 3rd Symp. Energy Metabolism. European Association for Animal Production. (k.L. Blaxter editor). EAAP Publication N°.11. Academic Press. London (Eds). pp 441-443.

Burgaya F, Peinado J, Vilaró S, Llobera M, & Ramírez I. (1989): Lipoprotein lipase activity in neonatal-rat liver cell types. *Biochemistry Journal*. 259:159-166.

Carrapiso AI, Timón ML, Petró MJ, Tejeda JF, & García C. (2000): In Situ Transesterification Of Fatty Acids From Iberian Pig Subcutaneous Adipose Tissue. *Meat Science*. 56:159-164.

Christensen KD, Zimmermann NG, Wyatt CL, Goodman TN, Buhr RJ, & Twining P. (1994): Dietary and environmental factors affecting skin strength in broiler chickens. *Poultry Science*. 73:224-35.

Clarke SD. (2000): Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition*. 83 (Suppl. 1): S59–S66.

Clunies M, & Leeson S. (1984): In vitro estimation of dry matter and crude protein digestibility. *Poultry Science*. 63:89-96.

Collin A, Buyse J, Van As P, Darras VM, Malheiros RD, Moraes VMB, Reyns GE, Taouis M, & Decuypere, E. (2003): Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *General and Comparative Endocrinology*. 130:70-77.

Collin A, Cassy S, Buyse J, Decuypere E, & Damon M. (2005): Potential involvement of mammalian and avian uncoupling proteins in the thermogenic effect of thyroid hormones. *Domestic Animal Endocrinology*. 29:78-87.

Collin A, Swennen Q, Metayer Coustard S, Skiba-Cassy S, Joubert R, Briclot G, Crochet S, Decuypere E, Buyse J, & Tesseraud S. (2007): Regulation of mitochondrial and tissue oxidation by thyroid hormones in chicken muscle. Paper presented at: ISEP2007. In: Proc. 2nd *International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition*; Vichy, France.

Collin A, Swennen Q, Skiba-Cassay S, Buyse J, Chartrin P, Le Bihan-Duval E, Crochet S, Duclos MJ, Joubert R, Decuypere E, & Tesseraud S. (2009): Regulation of fatty acid oxidation in chicken (*Gallus gallus*): Interactions between genotype and diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 153(2):171-177.

Cortinas L, Villaverde C, Galobart J, Baucells MD, Codony R, Barroeta AC. (2004): Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poultry Science*. 83:1155–1164.

Crespo N, & Esteve-Garcia E. (2001): Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science*. 80:71-78.

Crespo N, & Esteve-Garcia E. (2002a): Dietary polyunsaturated fatty acids decrease fat deposition in separable fat depots but not in the remainder carcass. *Poultry Science*. 81:512-518.

Crespo N, & Esteve-Garcia E. (2002b): Nutrient and fatty acid deposition in broilers fed different dietary fatty acid profiles. *Poultry Science*. 81:1533-1542.

Crespo N, & Esteve-Garcia E. (2002c): Dietary linseed oil produces lower abdominal fat deposition but higher de novo fatty acid synthesis in broiler chickens. *Poultry Science*. 81:1555-1562.

Cryer A, Riley SE, Williams ER, & Robinson DS. (1976): Effect of nutritional-status on rat adipose-tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities - their relationship to triglyceride fatty-acid uptake by fat-cells and to plasma-insulin concentrations. *Clinical Science and Molecular Medicine*. 50:213-221.

Cunningham O, McElligott AM, Carroll AM, Breen E, Reguenga C, Olierira MM, zevedo J, & Porter PK. (2003): Selective detection of UCPs expression in skeletal muscle: effect of thyroid status and temperature acclimation. *Biochemica et Biophysica Acta- Bioenergetics*. 1604:170-179.

Davison TF, Flack IH, & Butler EJ. (1978): binding of thyroxin and tri-iodothyronine to plasma-proteins in chicken at physiological pH. *Research in Veterinary Science*. 25:280-283.

De Groote G. (1974): Utilization of metabolizable energy. In: Morris TR, and Freeman BM, Br Poult Sci editors. *Energy Requirements of Poultry*. Edinburgh, UK. p.113-133.

Deaton JW, & Lott BD. (1985): age and dietary energy effect on broiler abdominal fat deposition. *Poultry Science*. 64(11): 2161-2164.

Decuypere E, Van As P, Van Der Geyten S, & Darras VM. (2005): Thyroid hormone availability and activity in avian species: a review. *Domestic Animal Endocrinology*. 29:63-77.

Dridi S, Onagbesana O, Swennena Q, Buyse J, Decuypere E, & Taouis M. (2004): Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 139:273-283.

Eaton S. (2002): Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Progress in Lipid Research*. 41:197-239.

Evock-Clover CM, Poch SM, Richards MP, Ashwell CM, & McMurtry JP. (2002): Expression of an uncoupling protein gene homolog in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 133(2):345-358.

Farrell DJ. (1981): An assessment of quick bioassays for determining the true metabolizable energy and apparent metabolizable energy of poultry feedstuffs. *World's Poultry Science*. 37: 72-83.

Fereidoun H, Bahram A, Soltanieh K, Abbass SA, & Pouria H. (2007): Mean percentage of skin and visible fat in 10 chicken carcass weights. *International Journal of Poultry Science*. 6(suppl. 1):43-47.

Ferrini G, Baucells MD, Esteve-Garcia E, & Barroeta AC. (2008): Dietary polyunsaturated fat reduces skin fat as well as abdominal fat in broiler chickens. *Poultry Science*. 87:528-535.

Ferrini G, Esteve-García E, & Barroeta AC. (2004): Efecto del perfil en ácidos grasos de la ración sobre el depósito lipídico de la piel y grasa abdominal en el broiler. In Proc. XLI Symposium Científico de Avicultura. Barcelona, Spain.

Ferrini G, Lachica M, Barroeta AC, Aguilera JF & Gasa J. (2007): The efficiency of utilization of metabolizable energy of diets rich in saturated or polyunsaturated fats in broiler chickens. In Proc. 2nd International Symposium of Energy and Protein Metabolism and Nutrition. Vichy, France.

Ferrini, G, Menoyo D, Esteve-Garcia E, & Barroeta AC. (2005): Effect of ω 3 or saturated dietary fatty acids on lipid metabolism parameters in broiler chickens. In Proc. 15th European Symposium of Poultry Nutrition. Balantofüred, Hungary.

Fielding, BA, & Frayn KN. (1998): Lipoprotein Lipase And The Disposition Of Dietary Fatty Acids. *British Journal of Nutrition*. 80:495-502.

Fossati P, & Prencipe L. (1982): Serum triglycerides determined calorimetrically with an enzyme that produces hydrogen-peroxide. *Clinical Chemistry*. 28:2077-2080.

Francesch M, Bernard K, & McNab J. (1999): Differences between type and apparent metabolisable energy of high-fiber diets. *Poultry Science*. 77(Supp. 1):12.

Fraser R, Heslop VR, Murray FEM, & Day WA. (1986): Ultra-structural studies of the portal transport of fat in chickens. *British Journal of Experimental Pathology*. 67:783-791.

Freeman CP. (1984): The digestion, absorptions and transport of fat-Non-ruminats. Fats in animla Nutrition. Ed. Wiseman, Butterworths, London. p. 105-122.

Fu Z, & Sinclair AJ. (2000): Increased α -linolenic acid intake increases tissue α -linolenic acid content and apparent oxidation with little effect on tissue docosahexaenoic acid in the guinea pig. *Lipids*. 35:395-400.

Fuller HL, & Rendon M. (1977): Energetic efficiency of different dietary fats for growth of young chicks. *Poultry Science*. 56:549-57.

Gabarrou JF, Duchamp C, Williams J, & Geraert PA. (1997): A role for thyroid hormones in the regulation of diet-induced thermogenesis in birds. *British Journal of Nutrition*. 78:963-973.

Goodridge AG, Thurmond DC, Baillie RA, Hodnett DW, & Xu G. (1998): Nutritional and hormonal regulation of the gene for malic enzyme. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 37:8-13.

Griffin HD, & Hermier D. (1988): Plasma Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. In: Leanness in Domestic Birds. Pp. 175-201. Butterworths, London.

Hakasson J, & Svensson SA. (1984): Gross energy content of fat and protein in different tissues of male broiler chickes. *Swedish Journal Agriculture Research*. 14:207-12.

Hu E, Tontonoz P, & Spiegelman BM. (1995): Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proceedings of the National Accademy of Science of USA*. 92:9856-60.

Hurwitz S, Bar A, Katz M, Sklan D, & Budowski P. (1973): Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *Journal of Nutrition*. 103:543-547.

Infiled JM, & Annison EF. (1973): The metabolism of palmitic, steric, oleic and linoleic acids in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 30(3):545-554.

Jackson-Hayes L, Song SL, Lavrentyev EN, Jansen MS, Hillgartner FB, Tian LQ, Wood PA, Cook GA, & Park EA. (2003): A thyroid hormone response unit formed between the promoter and first intron of the carnitine palmitoyltransferase-I alpha gene mediates the liver-specific induction by thyroid hormone. *The journal of Biological Chemistry*. 278:7964-7972.

- Jensen LS, Schumaier GW, & Latschaw JD. (1970): "Extra caloric" effect of dietary fat for developing turkeys as influenced by calories-protein ratio. *Poultry Science*. 49(6): 1697-1704.
- Jiang KJ, Jiao HC, Song ZG, Yuan L, Zhao JP, & Lin H. (2008): Corticosterone administration and dietary glucose supplementation enhance fat accumulation in broiler chickens. *British Poultry Science*. 49:625-631.
- Jucker BM, Ren J, Dufour S, Cao X, Previs SF, Underhill B, Cadman KS, & Shulman GI. (2000): ¹³C/³¹P NMR assessment of mitochondrial energy coupling in skeletal muscle of awake fed and fasted rats: relationship with uncoupling protein 3 expression. *Journal of Biological Chemistry*. 275:39279-39286.
- Kahl S, Rosebrough RW, & Elsasser TH. (1998): Hepatic iodothyronine 5'-monodeiodinase activity in the broiler chicken: effect of dietary fat and triiodothyronine (T3) supplementation. *Nutrition Research*. 18:1039-1047.
- Kameda, K. (1995): Thyroid-hormone inhibits fatty-acid synthase gene-transcription in chicken liver. *Molecular and cellular Biochemistry*. 144:105-108.
- Katsumata M, Matsumoto M, Kawakami S & Kaji Y. (2004): Effect of heat exposure on uncoupling protein-3 mRNA abundance in porcine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*. 82:3493-3499.
- Kavouridou K, Barroeta AC, Villaverde C, Manzanilla EG, & Baucells MD. (2008): Fatty acid, protein and energy gain of broilers fed different dietary vegetable oils. *Spanish Journal Agricultural Research*. 6:210-218.
- Keren-Zvi S, Nir I, Nitsan Z, & Chaner A. (1990): Effect of dietary concentrations of fat and energy on fat deposition in broilers divergently selected for high or low abdominal adipose tissue. *British Poultry Science*. 31(3): 507-516.
- Kleiber, M. (1961): *The fire of life: an introduction to animal energetics*. Wiley&sons, Inc. (Eds). Ney York.
- Kohler, GO, & Kuzmicky DD. (1970): Problems concerned with determinations and interpretation of metabolizable energy values. *Feedstuffs*, 42:18-19.
- Korver DR, & Klasing KC. (1997): Dietary fish oil alters specific and inflammatory immune responses in chicks. *Journal of Nutrition*. 127(10):2039-46.
- Kouba M, Catheline D, & Leclercq B. (1992): Lipogenesis In Turkeys And Chickens - A Study Of Body-Composition And Liver Lipogenic Enzyme-Activities. *British Poultry Science*. 33:1003-1014.
- Krogdahl A. (1985): Digestion and absorption of lipids in poultry. *Journal of Nutrition*. 115:675-685.

Kussaibati R, Guillaume J, & Leclercq B. (1982) The effects of age, dietary fat and bile salts, and feeding rate on apparent metabolisable energy values in chickens. *British Poultry Science*. 23:393-403.

Lachica M, Aguilera JF, & Prieto C. (1995): A confinement respiration chamber for short gaseous exchange measurements. *Archive Animal Nutrition*. 48:329-336.

Lachowicz K, Koszela-Piotrowska I, & Rosołowska-Huszcz D. (2008): Thyroid hormone metabolism may depend on dietary fat. *Journal of Animal Feed Science*. 17:110–119.

Lanni A, Beneduce L, Lombardi A, Moreno M, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, & Goglia F. (1999): Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Letters*. 444:250-254.

Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. (2003): Thyroid status hormone and uncoupling proteins. *FEBS Letters*. 543:5-10.

Laws BM: (1963): The lipase and esterase activities of the pancreas and small intestine of the chick. *The Biochemical Journal*. 87(3): 632-638.

Leenstra FR, Decuyper E, Beuving G, Buyse J, Berghman L, & Herremans M. (1991): Concentrations of hormones, glucose, triglycerides and free fatty-acids in the plasma of broiler-chickens selected for weight-gain or food conversion. *British Poultry Science*. 32:619-632.

Liang XF, Ogata HY, & Oku H. (2002): Effect of dietary fatty acids on lipoprotein lipase gene expression in the liver and visceral adipose tissue of fed and starved red sea bream *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 32:913-919.

Lindberg A, & Olivecrona G. (1995): Lipase Evolution - trout, xenopus and chicken have lipoprotein-lipase and apolipoprotein C-II-like activity but lack hepatic lipase-like activity. *Biochimica et Biophysica acta-Lipids and Lipid Metabolism*. 1255:205-211.

Madding JB, & Dietschy JM. (1989): A rapid method to assess the hydrophobicity of the intestinal microvillus membrane in vivo. *Journal of Lipid Research*. 30:1289-1296.

Madsen L, Rustan AC, Vaagenes H, Berge K, Dyroy E, & Berge KR. (1999): Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids*. 34:951–963.

Menoyo D, Lopez-Bote CJ, Bautista JM, & Obach A. (2003): Growth, digestibility and fatty acid utilization in large atlantic salmon (*salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. *Aquaculture*. 225:295–307.

Miller WS. (1974): The determination of metabolisable energy. In Energy Requirements of poultry. Morris, T.R. & Freeman, B.M. (Eds) pp. 91-112. *British Poultry Science*, Edinburgh.

Mollah Y, Bryden WL, Wallis IR, Balnave D, & E.F. A. (1983): Studies on low metabolisable energy for poultry using conventional and rapid assay procedures and the effects of processing. *British Poultry Science*. 24:81-89.

Mooradian AD, Albert SG. (1999): The age-related changes in lipogenic enzymes: the role of dietary factors and thyroid hormone responsiveness. *Mechanisms of Ageing and Development*. 108: 139-149.

Mossab A, Lessire M, Guillaumin S, Kouba M, Mourot J, Peiniau P, & Hermier D. (2002): Effect of dietary fats on hepatic lipid metabolism in the growing turkey. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 132:473-483.

Mu H, Høy CE. (2004): The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*. 43(2):105-133.

Mueller HL, & Kirchgessner M. (1995): Effect of olive oil and fish oil on thermogenesis and utilization of energy in a model study with sows. *Zeitschrift Fuer Ernahrungswissenschaft*. 34(2):143-150.

Mujahid A, Akiba Y, Kikusato M, & Toyomizu M. (2007): Up-regulation or activation of avian UCP attenuates mitochondrial ROS production and oxidative damage in broiler chickens exposed to acute heat stress. Paper presented at: ISEP2007. In Proc. 2nd International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition; Vichy, France.

Mulder C, Schouten JA, & Poppsnijders C. (1983): Determination of free fatty-acids - a comparative-study of the enzymatic versus the gas-chromatographic and the colorimetric method. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 21: 823-827.

Nelson DL, & Cox MM. (2000): Lehninger: principles of biochemistry W.H. Freeman and Company (Eds). New York, Usa.

Nelson GJ. (1992): Dietary fatty acids and lipids metabolism. In: fatty acids in food and their health implication. Ching Kuong Chow, (Eds) Pp. 437-471.

Newman RE, Bryden WL, Fleck E, Ashes JR, Buttemer WA, Storlien LH, & Downing JA. (2002): Dietary n-3 and n-6 fatty acids alter avian metabolism: metabolism and abdominal fat deposition. *British Journal of Nutrition*. 88:11-18.

Noy Y, & Skaln D. (1995): Digestion and absorption in the young chick. *Poultry Science*. 74(2):366-373.

NRC, (1994): Nutrient Requirement of Poultry, 9th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.

Ockner RK, & Manning JA. (1974): Fatty acid-binding protein in small intestine. *The Journal of Clinical Investigation*. 54:326-338.

- Pérez-Vendrell A, Francesch M, Caparó E, Esteve-García E, & Brufau J. (1992): Estimation of apparent metabolizable energy of barley using near-infrared reflectance techniques. In Proc. XIX World's Poultry Congress, Vol. 3. pp. 540: Amsterdam, The Netherlands.
- Pesti GM, Bakalli RI, Qiao M, & Sterling KG. (2002): A comparison of eight grades of fat as broiler feed ingredients. *Poultry Science*. 81:382-390.
- Proszkowiec-Weglarz M, Richards MP, Humphrey BD, Rosebrough RW, & McMurtry JP. (2009): AMP-activated protein kinase and carbohydrate response element binding protein: A study of two potential regulatory factors in the hepatic lipogenic program of broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. In Press, Accepted Manuscript.
- Raimbault S, Dridi S, Denjean F, Lachuer J, Couplan E, Bouillaud F, Bordas A, Duchamp C, Taouis M, & Ricquier D. (2001): An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochemical Journal*. 353:441-444.
- Ramirez I, Kryski AJ, Benzeev O, Schotz MC, & Severson, DL. (1985): Characterization Of Triacylglycerol Hydrolase Activities In Isolated Myocardial-Cells From Rat-Heart. *Biochemical Journal*. 232:229-236.
- Renner R, & Hill FW. (1961): Factors affecting the absorbability of saturated fatty acids in the chicks. *Journal of Nutrition*. 74:254:258.
- Reyns GE, Venken K, De Escobar GM, Kuhn ER, & Darras VM. (2003): Dynamics and regulation of intracellular thyroid hormone concentrations in embryonic chicken liver, kidney, brain, and blood. *General and Comparative Endocrinology*. 134:80-87.
- Rigoni MC, Castrovilli L, Rapetti I, & Toschi I. (2001): Energy metabolism in cocks fed different oil. In Proc. 15th Symposium on Energy Metabolism in Animal. Pp. 177-180. Snekkerstein, Denmark.
- Romijn C, & Lokhorst W. (1961): Some aspects of energy metabolism in birds. In Proc. 2nd Symposium on Energy Metabolism. Pp. 49–58. Wageningen, Germany.
- Rosebrough RW, Russell BA, & Richards MP. (2007): Responses of chickens subjected to thyroid hormone depletion-repletion. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 147(2):543-549.
- Rosebrough RW, Russell BA, Poch SM, & Richards MP. (2007): Expression of lipogenic enzymes in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 147(1):215-222.
- Rosebrough RW. (1999): Dietary fat and triiodothyronine (T-3) interactions in the broiler chicken. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 69:292-298.

Rosebrough, RW, Russell BA, & Richards MP. (2009): Effects of short term triiodothyronine administration to broiler chickens fed methimazole. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 150(1):72-78.

Saadoun A, & Leclercq B. (1983): Comparison of in-vivo fatty-acid synthesis of the genetically lean and fat chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 75:641-644.

Sakamoto K, Asano T, Furuya S, & Takahashi S. (1980): Estimation of in-vivo digestibility with the laying hen by an in vitro method using the intestinal fluid of the pig. *British Journal of Nutrition*. 43:389-391.

Sakomura NK, Longo FA, Oviedo-Rondon EO, Boa-Viagem, & Ferraudo M. (2005): Modeling energy utilization and growth parameter description for broiler chickens. *Poultry Science*. 84:1363-1369.

Salee VL. (1978): Determinants of fatty acid and alcohol monomer activities in mixed micellar solutions. *Journal of Lipid Research*. 19:207-214.

Sampath H, & Ntambi JM. (2005): Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 25:315-340.

Sanz M, Flores A, & Lopez-Bote CJ. (1999): Effect of fatty acid saturation in broiler diets on abdominal fat and breast muscle fatty acid composition and susceptibility to lipid oxidation. *Poultry Science*. 78:378-382.

Sanz M, Flores A, & Lopez-Bote CJ. (2000): The metabolic use of energy from dietary fat in broilers is affected by fatty acid saturation. *British Poultry Science*. 41:61-68.

Sanz M, Flores A, De Ayala P, & Lopez-Bote CJ. (1999): Higher lipid accumulation in broilers fed on saturated fats than in those fed on unsaturated fats. *British Poultry Science*. 40:95-101.

Sanz M, Lopez-Bote CJ, Menoyo D, & Bautista JM. (2000): Abdominal Fat Deposition And Fatty Acid Synthesis Are Lower And B-Oxidation Is Higher In Broiler Chickens Fed Diets Containing Unsaturated Rather Than Saturated Fat. *Journal of Nutrition*. 130:3034-3037.

SAS Institute (2000): User's Guide: Statistics. SAS Institute, Cary, Nc.

Sato K, & Akiba Y. (2002): Lipoprotein lipase mRNA expression in abdominal adipose tissue is little modified by age and nutritional state in broiler chickens. *Poultry Science*. 81:846-852.

Sato, K, Takahashi T, Takahashi Y, Shiono H, Katoh N, & Akiba Y. (1999): Preparation of chylomicrons and VLDL with monoacid-rich triacylglycerol and characterization of kinetic parameters in lipoprotein lipase-mediated hydrolysis in chickens. *Journal of Nutrition*. 129:126-131.

Selverej RK, & Purushothaman MR. (2004): Nutritive value of full-fat sunflower seed in broiler diet. *Poultry Science*. 83:441-446.

Shiau YF. (1981): Mechanism of intestinal fat absorption. *The American Journal of Physiology*. 240(1): 1-9.

Shimomura Y, Tamura T, & Suzuki M. (1990): Less body fat accumulation in rats fed a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet. *Journal of Nutrition*. 120:1291-1296.

Sibbald IR, & Slinger SJ. (1962): Factors affecting the metabolizable energy in poultry feeds. *Poultry Science*. 41:573-578.

Sibbald IR, & Slinger SJ. (1963): A biological assay for metabolizable energy in poultry feed ingredients together with findings which demonstrate some of the problems associated with the evaluation of fats. *Poultry Science*. 42:313-325.

Sibbald IR, Price K, & Barrete JP. (1980): True metabolizable energy values for poultry of commercial diets measured by bioassay and predicted from chemical data. *Poultry Science*. 59:808-811.

Sklan D, Cohen N, & Hurwitz S. (1996): Intestinal uptake and metabolism of fatty acids in the chick. *Poultry Science*. 75:1104-1108.

Stryer R, Berg JM, & Tymoczko JL. (2002): Biochemistry. W.E. Freeman & Company (Eds.). New York.

Surkhija PS, & Palmquist DL. (1988): Rapid method of determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and faeces. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 36:1202-1206.

Swennen Q, Janssens GPJ, Millet S, Vansant G, Decuypere E, & Buyse J. (2005): Effects of substitution between fat and protein on feed intake and its regulatory mechanisms in broiler chickens: Endocrine functioning and intermediary metabolism. *Poultry Science*. 84:1051-1057.

Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, & Suzuki M. (1995): Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid sunflower oil diet, a sunflower oil diet or linseed oil diet. *Journal of Nutrition*. 125:920-925.

The Council of the European Communities. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the member states regarding the protection of animals used for experimental and scientific purposes.

Thurmond DC, & Goodridge AG. (1998): Characterization of thyroid hormone response elements in the gene for chicken malic enzyme - factors that influence triiodothyronine responsiveness. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:1613-1622.

Toyomizu M, Ueda M, Sato S, Seki Y, Sato K, & Akiba Y. (2002): Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chickens skeletal muscle. *FEBS Letters*. Oct 9; 529 (2-3):313-8.

Valdes EV, & Leeson S. (1992a): Measurement of metabolizable energy in poultry feeds by an in vitro system. *Poultry Science*. 71:1493-1503.

Valdes EV, & Leeson S. (1992b): Near Infrared Reflectance analysis as a method to measure metabolizable energy in complete poultry feeds. *Poultry Science*. 71:1179-1187.

Valencak, TG, & Ruf T. (2007): N-3 polyunsaturated fatty acids impair lifespan but have no role for metabolism. *Aging Cell*. 6(1):15-25.

Van Der Geyten S, Van Rompaey E, Sanders JP, Visser TJ, Kuhn ER, & Darras VM. (1999): Regulation of thyroid hormone metabolism during fasting and refeeding in chicken. *General and Comparative Endocrinology*. 116:272-280.

Viguerie N, & Langin D. (2003): Effect of thyroid hormone on gene expression. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 6:377-381.

Vilaro S, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. (1988): Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role. *The American Journal of Physiology*. 254:11-22.

Villaverde C, Baucells MD, Cortinas L, & Barroeta AC. (2006): Effects of dietary concentration and degree of polyunsaturation of dietary fat on endogenous synthesis and deposition of fatty acids in chickens. *British Poultry Science*. 47:173-179.

Villaverde C, Baucells MD, Cortinas L, Hervera M, & Barroeta AC. (2005): Chemical composition and energy content of chickens in response to different levels of dietary polyunsaturated fatty acids. *Archives of Animal Nutrition*. 59:281-292.

Villaverde C, Cortinas L, Barroeta AC, Martín-Orúe SM, & Baucells MD. (2004): Relationship between dietary unsaturation and vitamin E in Poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 88:143-149.

Wang PH, Ko YH, Chin HJ, HSU C, Ding ST & Chen CY. (2009): The effect of feed restriction on expression of hepatic lipogenic genes in broiler chickens and the function of SREBP1. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. In Press, Corrected Proof.

Wieland OH. (1984): In methods of enzymatic analysis, vol. VI, pp. 504-510 (Bergmeyer, H. U, Editor). Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.

Wiseman J, & Lewis CE. (1998): Influence of dietary energy and nutrient concentration of the growth of body weight and carcass components of broiler chickens. *Journal of Agricultural Research*. 131:361-71.

Wiseman J, & Salvador F. (1991): The influence of free fatty acid content and degree of saturation on the apparent metabolizable energy value of fats fed to broilers. *Poultry Science*. 70:573-582.

Yeh SJC, & Leveille GA. (1973): Significance of skin as a site of fatty-acid and cholesterol-synthesis in chick. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine*. 142: 115-119.

Yuan L, Lin H, Jiang KJ, Jiao HC, & Song ZG. (2008): Corticosterone administration and high-energy feed results in enhanced fat accumulation and insulin resistance in broiler chickens. *British Poultry Science*. 49:487–495.

Zerehdaran A, Vereijken ALJ, van Arendok JAM, & van der Waaij EH. (2004): Estimation of genetic parameters for fat deposition and carcass traits in broilers. *Poultry Science*. 83:521-525.