



Effect of diets with avocado meal on lipids in muscle, antioxidants and gene expression in finished pigs

Efecto de dietas con harina de aguacate sobre lípidos en músculo, antioxidantes y expresión de genes en cerdos finalizados

Lemus-Avalos, G.^{1,2}, Lemus-Flores, C.^{1,2*}, Bugarín-Prado, J.O.², Grageola-Núñez, F.², Ayala-Valdovinos, M.A.³, Duifhuis-Rivera, T.³, Moo-Huchin, V. M.⁴, Dzib-Cauich D.⁴

Universidad Autónoma de Nayarit, ¹Alumno de Maestría en el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, ²Laboratorio de fisiología nutricional; Unidad Académica de Agricultura. Xalisco, Nayarit; México. ³Departamento de Producción Animal, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco; México. ⁴Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, Yucatán; México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Lemus-Avalos G., Lemus-Flores, C., Bugarín-Prado, J.O., Grageola-Núñez, F., Ayala-Valdovinos, M.A., Duifhuis-Rivera, T., Moo-Huchin, V. M., Dzib-Cauich, D. (2020). Effect of diets with avocado meal on lipids in muscle, antioxidants and gene expression in finished pigs. *Revista Bio Ciencias* 7, e968. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e968>



ABSTRACT

The aim of this investigation was to assess the effect level of inclusion of avocado meal (AM) at 0, 5 and 10 % in pigs diet for 56 days before their slaughter, on effects in regard to proximal chemical composition, presence of antioxidants, lipid modulation in the *Longissimus dorsi* and gene expression in the *Longissimus dorsi* muscle and liver tissues. Eight male pigs of 55 ± 3 kg of initial weight were used in each diet group to compare them under a completely random design, with variance analysis and Tukey test. The gene expression in each tissue was analyzed with a mixed-effects model, comparing the values of change or fold change (FC) of diets with AM against diet control. Levels of γ-tocopherol, total phenolic compounds, antioxidant activity ABTS and DPPH are increased linearly with the inclusion of AM in the diet, decreasing intramuscular fat. In

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: April 07th 2020.

Accepted/Aceptado: September 13th 2020.

Available on line/Publicado: September 29th 2020.

*Corresponding Author:

Clemente Lemus Flores. Universidad Autónoma de Nayarit. Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Carretera Xalisco-Compostela km 3.5, Xalisco, Nayarit; México. Phone. +52 311 127 3504. E-mail: clemus@uan.edu.mx

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue valorar el nivel de inclusión de harina de aguacate (AM) al 0, 5 y 10 % en la alimentación de cerdos por 56 días antes del sacrificio, sobre efectos en composición química proximal, presencia de antioxidantes, modulación de los lípidos en el músculo *Longissimus dorsi* y expresión de genes en los tejidos *Longissimus dorsi* e hígado. Se emplearon en cada dieta ocho cerdos machos de 55 ± 3 kg de peso inicial, para compararlas bajo un diseño completamente al azar, con análisis de varianza y prueba de Tukey. La expresión de genes en cada tejido fue analizada con un modelo de efectos mixtos, comparando los valores de cambio o fold change (FC) de las dietas con AM contra la dieta control. Los niveles de γ-tocopherol, compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante ABTS y DPPH se incrementan linealmente con inclusión de AM en la dieta, disminuyendo grasa intramuscular. En AM5 contra H0, la alta expresión de genes lipogénicos (*ACACA*, *ACP* y *FASN*) en el músculo *Longissimus dorsi*, se asoció al aumento de los ácidos grasos araquidónico (20:4-n6) y eicosapentaenoico (20:3-n3). La esterificación de ácidos grasos (*SCD*) se asoció

AM5 against AM0, the high expression of lipogenic genes (*ACACA*, *ACP* and *FASN*) in the *Longissimus dorsi* muscle was associated with the increase of arachidonic fatty acids (20:4-n6) and eicosapentaenoic (20:3-n3). Fatty acid esterification (*SCD*) was associated with decreased stearic acid (18:0) and increased higher 18:1/18:0 ratio. With AM10 against AM0, the expression of *ACACA*, *SCD*, *ACP*, and *FASN* were low in both tissues, decreasing in the muscle *Longissimus dorsi* palmitic acid (16:0); increased: arachidonic (20:0) and linoleic (18:2 n6) acids, PUFA, PUFA/SFA and PUFA/MUFA.

KEY WORDS

Avocado meal, antioxidants, muscle fatty acids, gene expression, pigs, swine diet.

Introduction

In recent decades there has been a tendency to promote production of meat with lower amounts of fat, due to critics by nutritionists for its possible contribution to the development of some diseases (Wood & Enser, 2017). It is commonly believed that the composition of fatty acids in meat is a causal factor in the incidence of these types of disorders, but it is possible to modulate the amount of intramuscular fat (IMF) and its quality by the modification on the lipid profile in livestock diet, aiming to increase polyunsaturated fatty acids (Wood *et al.*, 2008; Wood & Enser, 2017). The IMF is relevant to the quality of pork; too much can affect human health causing obesity or diabetes (Katsumata, 2011). For example, of the modification of the lipid profile is the studies carried out on Iberian pigs fed with acorn, which is a source of monounsaturated fatty acids. For example, lipidic profile in Iberic pigs has been proven to be modified by feeding with acorns, which are a source of monounsaturated fatty acids. In this study, it is reported that lipids in meat were modified to profiles containing more mono and polyunsaturated fatty acids, which give the added value of increased palatability of meat products and offer a healthier alternative to the consumer (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2010). There is interest in explaining the effect of food upon the molecular regulation of lipogenesis. In the research of Benítez *et al.* (2018) and Duran-Montgé *et al.* (2009^a), it has been shown that fat composition can be modulated by implementing diets which are rich in unsaturated fatty acids and that the gene expression

to the diminución del ácido esteárico (18:0) y aumento de mayor relación 18:1/18:0. Con AM10 contra AM0, la expresión de *ACACA*, *SCD*, *ACP* y *FASN* fue baja en ambos tejidos, disminuyendo en el músculo *Longissimus dorsi* el ácido palmítico (16:0); aumentando: los ácidos araquídico (20:0) y linoleico (18:2 n6), PUFA, PUFA/SFA y PUFA/MUFA.

PALABRAS CLAVE

Harina de aguacate, antioxidantes, ácidos grasos en músculo, expresión de genes, cerdos, alimento porcino.

Introducción

En las últimas décadas se ha observado una tendencia a producir carne con menor cantidad de grasa, debido a que la carne ha sido criticada por algunos nutricionistas por su posible contribución al desarrollo de algunas enfermedades (Wood & Enser, 2017). Se tiene la creencia común de que la composición de los ácidos grasos en la carne es un factor causal en la incidencia de este tipo de trastornos, pero es posible modular la cantidad de grasa intramuscular (IMF) y su calidad, modificando el perfil lipídico a través de la alimentación, para aumentar los ácidos grasos poliinsaturados (Wood *et al.*, 2008; Wood & Enser, 2017). La IMF es relevante para la calidad de la carne del cerdo, en exceso puede afectar la salud humana causando obesidad o diabetes (Katsumata, 2011). Como ejemplo en la modificación del perfil lipídico, son los estudios realizados en cerdos ibéricos alimentados con bellota, que es una fuente de ácidos grasos monoinsaturados. Reportan que los lípidos de la carne fueron modificados a perfiles más monoinsaturados y poliinsaturados, lo cual integra un valor añadido a la palatabilidad de los productos cárnicos y ofrece un alimento saludable al consumidor (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2010). Existe el interés de explicar el efecto, que tiene la alimentación sobre la regulación molecular de la lipogénesis. En investigaciones de Benítez *et al.* (2018) y Duran-Montgé *et al.* (2009^a), se ha demostrado que la composición de la grasa se puede modular, mediante la implementación de dietas ricas en ácidos grasos insaturados, y que la expresión de genes es diferente en cada tejido, de acuerdo con cada ingrediente que se utilice en el alimento. La expresión de los genes del metabolismo de los lípidos, proporciona nuevos conocimientos sobre el depósito de grasa intramuscular y los cambios en el perfil lipídico (Wang *et al.*, 2020). Se han identificado los genes *ACACA* (Acetil Co-A carboxilasa

is different in each tissue, according to each ingredient used in the feed. Knowledge of the expression of lipidic metabolic genes provides new insights into intramuscular fat deposition and changes in lipidic profile (Wang *et al.*, 2020). The genes acetyl-CoA carboxylase alpha (*ACACA*), stearoyl-CoA desaturase (*SCD*), sterol regulatory element-binding protein 1 (*SREBP1*), Acyl Carrier Protein (*ACP*) and Fatty Acid Synthase (*FASN*) are associated with lipid metabolism in pigs, have been identified by Duran-Montg e *et al.* (2009^a, 2009^b). The enzyme *ACACA* in conjunction with *ACP* and *FASN*, play a fundamental role in fatty acids metabolism by catalyzing the formation of malonyl-CoA (acetyl-ACP and malonyl-ACP) from acetyl-CoA which, in turn, acts as an intermediary in the *de novo* synthesis of long chain fatty acids (Duran-Montg e *et al.*, 2009^a; Muñoz *et al.*, 2007). *SCD* is related to fatty acids esterification; *ACP*, *ACACA* and *FASN* to lipogenesis, and *SREBP1* as a transcription factor and regulator of the expression of different lipogenic genes (Benitez *et al.*, 2018; Fernandez *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Mohan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020). The change in diet can modify the proportion of lipids, to the point that pork meat can provide a health benefit to the consumer (Duran-Montg e *et al.*, 2009^a, 2009^b). Nevertheless, meat is more susceptible to the oxidative breakdown of lipids when polyunsaturated acids increase; thus, the use of natural antioxidants helps to delay this process, in addition to improving the quality of the meat (He *et al.*, 2010; Hern andez-López *et al.*, 2016^a).

Avocado (*Persea americana* Mill) is a fruit that gathers important nutritional characteristics, with the contribution of liposoluble vitamins (vitamin E) that serve as antioxidants, phenolic compounds, lacks cholesterol, with a low percentage of saturated fatty acids, and in contrast a high content of unsaturated fatty acids (M endez-Z niga *et al.*, 2019). Furthermore, in avocado-formulated diets, the rectal digestibility of nutrients is relatively high (Grageola *et al.*, 2010; Hern andez-López *et al.*, 2016^a; Franquez *et al.*, 2017). Feeding whole avocado meal to pigs, can influence the increase of polyunsaturated fatty acids content and modulate the expression of genes involved in lipidic metabolism. Thus, this research aimed to investigate the effect of the amount of avocado meal inclusion, in the feeding of finished pigs for 56 days before slaughter/sacrifice, on the proximal chemical composition, presence of antioxidants, lipidic modulation in the *Longissimus dorsi* muscle and gene expression in *Longissimus dorsi* and liver tissues.

alfa), *SCD* (Estearoil-CoA desaturasa), *SREBP1* (proteína de unión al elemento regulador del estero), *ACP* (Proteína transportadora de acilos) y *FASN* ( cido-grasosintasa), asociados al metabolismo lipídico en cerdos Duran-Montg e *et al.* (2009^a, 2009^b). La enzima acetil-CoA carboxilasa (*ACACA*) junto con *ACP* y *FASN*, desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos, catalizando la formación de malonil-CoA (acetil-ACP y malonil-ACP) a partir de acetil-CoA que, a su vez, actúa como intermediario en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos de cadena larga (Duran-Montg e *et al.*, 2009^a; Muñoz *et al.*, 2007). La *SCD* se relaciona con esterificación de ácidos grasos; *ACP*, *ACACA* y *FASN* a lipogénesis, y *SREBP1* como factor de transcripción y regulación de la expresión de diferentes genes lipogénicos (Benitez *et al.*, 2018; Fern andez *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Mohan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020). El cambio en la dieta puede modificar las proporciones de los lípidos, hasta llegar al punto de que la carne, pueda aportar un beneficio a la salud del consumidor (Duran-Montg e *et al.*, 2009^a, 2009^b). Sin embargo, la carne tiene mayor susceptibilidad al deterioro oxidativo de los lípidos, al incrementar los ácidos poliinsaturados; el empleo de antioxidantes naturales ayuda a retardar este proceso, además de mejorar la calidad de la carne (He *et al.*, 2010; Hern andez-López *et al.*, 2016^a). El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto que reúne características nutricionales importantes, con el aporte de las vitaminas liposolubles (vitamina E) que fungen como antioxidantes, compuestos fenólicos, sin colesterol, con un bajo porcentaje de ácidos grasos saturados y en contraste un alto contenido de ácidos grasos insaturados (M endez-Zúniga *et al.*, 2019). Además, en dietas formuladas con aguacate, la digestibilidad rectal de los nutrientes es relativamente alta (Grageola *et al.*, 2010; Hern andez-López *et al.*, 2016^a; Franquez *et al.*, 2017). Alimentar con harina de aguacate entero a los cerdos, puede influir para incrementar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados y en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos. El objetivo de esta investigación fue investigar el efecto del nivel de inclusión de harina de aguacate, en la alimentación de cerdos finalizados por 56 días antes del sacrificio, sobre la composición química proximal, presencia de antioxidantes, modulación de los lípidos en el *Longissimus dorsi* y expresión de genes en los tejidos *Longissimus dorsi* e hígado.

Material y Métodos

Animales y dietas.

Este estudio se realizó en el laboratorio de

Material and Methods

Animals and diets.

This study was performed by the laboratory of nutritional physiology of the "Unidad Académica de Agricultura", of the "Universidad Autónoma de Nayarit" in Mexico. For this study, 24 male neutered Landrace-Yorkshire pigs were used with an initial weight of 55 ± 3 kg, in the fattening stage were used, housing one pig per corral with individual access to food and water, fed *ad libitum*, according with the recommendations of the official animal welfare NOM-062-ZOO-1999. Following five days of adaptation to the assigned diet, plus 56 days of experimental diet, the pigs were sacrificed by a method approved by national regulation contained in the NOM-033-SAG/ZOO-2014, reaching an average live weight of 109 ± 4 kg. Avocado meal obtention was done as described by Lemus *et al.* (2017), using avocados of the Hass variety discarded for human consumption due to their small size or physical damage, collected from packing plants. Avocados were left at room temperature until they reached consumption maturity, whole and fresh fruits (pulp, seed and peel) were ground, producing a paste that was dried at room temperature for four days, ground a second time to obtain a meal, which was stored at room temperature in plastic containers without addition of any preservative or other substances. Pigs were distributed in groups of equal

fisiología nutricional de la Unidad Académica de Agricultura, de la Universidad Autónoma de Nayarit-México. Se utilizaron 24 cerdos machos castrados cruce de Landrace-Yorkshire con un peso inicial de 55 ± 3 kg en etapa de engorda, alojando un cerdo en cada corral con comedero y bebedero, alimentados *ad libitum*, de acuerdo con las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Después de cinco días de adaptación a la dieta asignada, más 56 días de alimentación experimental, los cerdos fueron sacrificados bajo la normativa NOM-033-SAG/ZOO-2014, alcanzando un peso vivo promedio de 109 ± 4 kg. La obtención de harina de aguacate se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Lemus *et al.* (2017), utilizando aguacates de la variedad Hass descartados para el consumo humano por su tamaño pequeño o daño físico, recolectado en plantas empacadoras. Los aguacates se dejaron a temperatura ambiente hasta que alcanzaron su madurez de consumo, se molieron frutos enteros y en forma fresca (pulpa, semilla y cascara), produciendo una pasta que se secó a temperatura ambiente por cuatro días, molida por segunda vez para obtener una harina, que se almacenó a temperatura ambiente en contenedores de plástico, sin adición de ninguna sustancia conservadora o de otro tipo. Los cerdos fueron distribuidos en igual número ($n=8$) y se les proporcionó una de tres diferentes dietas, con diferente inclusión de harina de aguacate (AM) mezclada en la dieta; AM0, AM5 y AM10 que corresponden al 0 (control), 5 y 10 % de la materia seca (Tabla 1).

Table 1.
Ingredients, calculated chemical composition and fatty acid analysis (%) of experimental diets (dry matter).

Tabla 1.
Ingredientes, composición química calculada y análisis de ácidos grasos (%) de las dietas experimentales (materia seca).

Ingredients, %	AM0	AM5	AM10
Corn	81.205	75.780	70.490
Avocado meal	0	5	10
Soybean meal	15.3	15.65	15.95
L-Lysine	0.125	0.12	0.11
Calcium carbonate	0.82	0.82	0.82
Calcium phosphate	0.65	0.73	0.73
NaCl	0.10	0.10	0.10
Vitamins and minerals premix	0.30	0.30	0.30
Zeolite	1.50	1.50	1.50
Total	100.00	100.00	100.00

AM: Avocado meal. 0, 5 and 10 %.
AM: Harina de aguacate. 0, 5 y 10 %.

number (n=8) and were provided with one of three different diets, with different percentage of inclusion of avocado meal (AM) mixed in the diet; AM0, AM5 and AM10 corresponding to 0 (control), 5 and 10 % of dry matter (Table 1).

Samples.

At the time of sacrifice, a sample of approximately 100 g of the *Longissimus dorsi* muscle was collected, packaged under vacuum and frozen at a temperature of -20 °C, until its use in chemical analysis. Additionally, at slaughter, three samples of approximately 0.5 g were taken from inside the *Longissimus dorsi* muscle and liver for gene expression analysis. The samples were collected in 2.0 mL cryotubes on ice, with a nucleic acid stabilizing solution (DNA/RNA Shield, Zymo Research, USA) and stored at -20 °C until use.

Analysis of proximal chemical composition and γ -tocopherol of the *Longissimus dorsi* muscle.

The chemical composition was determined following the method described by the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1997) for moisture (925.10), ash (923.03), proteins (920.87) and lipids (920.39). Quantification of γ -tocopherol was performed with 500 mg of intramuscular fat (IMF) diluted in 1 mL of 2-propanol. The determination was done by High-performance liquid chromatography (HPLC). The separation was done in a Nucleosil C18 reverse phase column (250 mm x 4.6 mm, particle size 5 μ m) (Can-Cauich *et al.*, 2019). The system operated by isocratic elution with a flow rate of 1 mL/min, with spikes registered at 285 and 335 nm as wavelength of excitation and emission, respectively. The volume of injection was 20 μ L. Identification of retention time and quantification of the peaks was done comparing to a standard of γ -tocopherol. Results were expressed as μ g of γ -tocopherol/g of fresh weight sample.

Determination of the total phenolic compounds (TPC) content, antioxidant activity of DPPH and ABTS of the *Longissimus dorsi* muscle.

5 g of each sample of *Longissimus dorsi* muscle were used, mixed with 10 mL of distilled water and then placed in a Grant XB3 ultrasound bath (Boekel Scientific Inc, USA.), for 30 minutes in a cold-water bath. The resulting extract was centrifuged at 3,500 x g for 15 min at 4°C, the supernatant was filtered with Whatman No. 42 paper. The filtered solution was stored at -20°C, until analysis. The

Muestras.

Al momento del sacrificio, se tomó una muestra de aproximadamente 100 g del músculo *Longissimus dorsi*, se empacó al vacío y se congeló a una temperatura de -20 °C, hasta su uso en los análisis químicos. También, al momento del sacrificio se tomaron tres muestras de aproximadamente 0.5 g, del interior del músculo *Longissimus dorsi* e hígado, para el análisis de expresión genética. Las muestras se colectaron en criotubos de 2.0 mL sobre hielo, con una solución estabilizadora de ácidos nucleicos (DNA/RNA Shield, Zymo Research, USA) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Análisis de la composición química proximal y γ -tocopherol del músculo *Longissimus dorsi*.

Se determinó la composición química siguiendo la metodología descrita por la Association of Official Agricultural Chemists AOAC (1997) para humedad (925.10), cenizas (923.03), proteínas (920.87) y lípidos (920.39). La cuantificación de γ -tocopherol se realizó con 500 mg de grasa intramuscular (IMF) diluida en 1 mL de 2-propanol. La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La separación se realizó en una columna Nucleosil C18 de fase inversa (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μ m) (Can-Cauich *et al.*, 2019). El sistema fue operado isocráticamente a un flujo de 1 mL/min, y los picos se registraron a 285 y 335 nm como longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente. El volumen de inyección fue 20 μ L. La identificación y cuantificación de los picos se realizaron por comparación con el estándar auténtico de γ -tocopherol. Los resultados fueron expresados como μ g de γ -tocopherol/g de muestra en peso fresco.

Determinación del contenido de Compuestos Fenólicos Totales (TPC), actividad antioxidante DPPH y ABTS del músculo *Longissimus dorsi*.

Se utilizó 5 g de cada muestra de músculo *Longissimus dorsi*, mezclada con 10 mL de agua destilada y colocada en un baño de ultrasonido Grant XB3 (Boekel Scientific Inc, USA.), por 30 minutos en un baño con agua fría. El extracto resultante fue centrifugado a 3,500 x g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue filtrado con papel Whatman No. 42. El filtrado obtenido fue almacenado a -20°C, hasta la medición del contenido de TPC y actividad antioxidante. El contenido de TPC de las muestras fue analizado de acuerdo al método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Moo-Huchin *et al.*, 2014). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico

TPC content of the samples was analyzed according to the Folin-Ciocalteu colorimetric method (Moo-Huchin *et al.*, 2014). The results were expressed as mg equivalent to gallic acid (GA)/100 g of meat. The antioxidant activity (DPPH and ABTS) of the meat extracts was measured according to the methodology described by Moo-Huchin *et al.* (2014). For both analyses, a calibration curve was established using Trolox as standard, and the results were expressed as μM equivalent of Trolox/100 g of meat.

Fatty acid analysis of the *Longissimus dorsi* muscle.

The lipids of the *Longissimus dorsi* muscle were extracted following the procedure of Hanson & Olley (1963), 500 mg of fat was converted into methyl esters of fatty acids with methanol of potassium hydroxide (KOH) and boron trifluoride (BF_3) (Morrison & Smith, 1964). For the chromatographic analysis a gas chromatography equipment model Trace GC Ultra from Thermo scientific (USA) was used. The chromatographic system was coupled to a flame ionization detector, set at a temperature of 250 °C and with a gas flow of helium (He) of 35 mL/min, air of 350 mL/min, With an injector temperature of 250 °C. An HP-Innowax capillary column of 60 m by 0.32 mm internal diameter and 0.25 μm particle thickness was used for the separation of fatty acids, using He as carrier gas with a flow rate of 3 mL/min. The separation of fatty acid methyl esters (FAME) was achieved using a temperature ramp starting at 60 °C for 3.5 min, increasing by 10 °C/min until it reaches 200 °C and this temperature was maintained for 15 min, then another increase of 1 °C/min until a temperature of 225 °C was reached, and another of 2 °C/min until 240 °C which was maintained for 12.5 min. The fatty acid methyl esters of the samples were identified by comparing their retention times with the corresponding FAME of a 37 component standard mix (Supelco 37 Component FAME Mix 47885-U Sigma-Aldrich). The fatty acids were expressed as the ratio of each individual fatty acid to the total area of the identified fatty acids in the samples.

Analysis of gene expression in the *Longissimus dorsi* muscle and liver.

From the tissues collected, 75 mg were weighed, and RNA extraction was done using the nucleic acid extraction kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, USA), following the manufacturer's instructions, the RNA concentration and purity were quantified by spectrophotometry with a Nanodrop. Subsequently,

(AG)/100 g de carne. La actividad antioxidante (DPPH y ABTS) de los extractos de carne fue medida siguiendo la metodología publicada por Moo-Huchin *et al.* (2014). Para ambos análisis, una curva de calibración fue preparada usando Trolox como estándar, y los resultados fueron expresados como μM equivalentes de Trolox/100 g de carne.

Análisis de ácidos grasos del músculo *Longissimus dorsi*.

Los lípidos del músculo *Longissimus dorsi* se extrajeron siguiendo el procedimiento de Hanson & Olley (1963), 500 mg de grasa fue convertida en ésteres metílicos de ácidos grasos con metanólica de hidróxido de potasio (KOH) y de trifluoruro de boro (BF_3) (Morrison & Smith, 1964). Para el análisis cromatográfico se empleó un equipo de cromatografía de gases modelo Trace GC Ultra de la marca Thermo scientific (USA). El sistema cromatográfico fue acoplado a un detector de ionización de flama, fijada a una temperatura de 250 °C y con flujo de gas He de 35 mL/min, aire de 350 mL/min, a una temperatura del inyector de 250 °C. Para la separación de los ácidos grasos se utilizó una columna capilar HP-Innowax, de 60 m por 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de la partícula, utilizando He como gas acarreador con un flujo de 3 mL/min. La separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos fue lograda usando una rampa de temperatura: inicial de 60 °C por 3.5 min, 10 °C/min hasta 200 °C y se mantuvo por 15 min, 1 °C/min hasta 225 °C, 2 °C/min hasta 240 °C y se mantuvo por 12.5 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos de las muestras fueron identificadas, comparando sus tiempos de retención, con los correspondientes FAME de una mezcla de estándares de 37 componentes conocidos (Supelco 37 Component FAME Mix 47885-U Sigma-Aldrich). Los ácidos grasos fueron expresados, como la proporción de cada ácido graso individual, respecto al total del área de los ácidos grasos identificados en la muestra.

Análisis de expresión de genes en músculo *Longissimus dorsi* e hígado.

De los tejidos colectados se pesaron 75 mg, para la extracción de RNA se utilizó el kit de extracción de ácidos nucleicos Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se cuantificó su concentración y pureza por medio de espectrofotometría con Nanodrop. Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de cDNA, con 1000 ng de RNA de cada muestra, utilizando el kit Maxima H Minus First Strand

cDNA synthesis was performed, with 1000 ng RNA from each sample, using the Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific, USA), according to the manufacturer's instructions.

Expression of the *ACACA*, *SCD*, *SREBP1*, *ACP* and *FASN* genes, reported by Duran-Montgé *et al.* (2009^a, 2009^b) and associated with lipid metabolism in pigs (Table 2), were evaluated. The endogenous gene *RNA18S* was used to normalize gene expression in a real-time PCR (qPCR) using the SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) kit (Fermentas, USA), with a final volume of 20 μ L per reaction tripled in each sample, using a Step One Plus real-Time PCR equipment (Applied Biosystems, Stockholm, Sweden). The real-time amplification was carried out in 40 cycles, considering the following conditions: initial denaturation (95 °C for 8min), cycling (95 °C for 15s and 60 °C for 30s). The specificity of the amplification of each gene was confirmed by analysis of melting curve, the temperature ramp of this analysis was 60°C to 95°C for 5s. The reading for the

cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se evaluó la expresión de los genes *ACACA* (Acetil Co-A carboxilasa alfa), *SCD* (Esteroil-CoA desaturasa), *SREBP1* (proteína de unión al elemento regulador del estero), *ACP* (Proteína transportadora de acilos) y *FASN* (Ácido-grasosintasa), reportados por Duran-Montgé *et al.* (2009^a, 2009^b) y asociados al metabolismo lipídico en cerdos (Tabla 2). El gen endógeno *RNA18S* se utilizó para normalizar la expresión de los genes, en una PCR en tiempo real (qPCR) empleando el kit SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, USA), con un volumen final de 20 μ L por reacción triplicada en cada muestra, en un equipo Step One Plus real Time PCR (Applied Biosystems, Stockholm, Sweden). La amplificación en tiempo real se llevó a cabo en 40 ciclos, considerando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (95 °C por 8min), ciclado (95 °C por 15s y 60 °C por 30s). La especificidad de la amplificación de cada arreglo fue confirmada por el análisis de curva de disociación, la rampa de temperatura

Table 2.
Primers sequences used for analyzing gene expression.

Tabla 2.
Secuencia de los primers usados para análisis de expresión.

Target	Primers Forward and Reverse (5' → 3')	Product length (bp)	size (bp)	(bp)ud	TM°C	Gene accession	Bank
<i>ACACA</i>	F- ATGTTTCGGCAGTCCCTGAT						
	R- TGTGGACCAGCTGACCTTGA	133			62	AF175308	
<i>SCD</i>	F- GCCGAGAAGCTGGTGATGTT						
	R- CAGCAATACCAGGGCAGCAT	95			56	AY487829	
<i>SREBP1</i>	F- CGGACGGCTCACAATGC						
	R- GACGGCGGATTTATTCAGCTT	114			64	NM_214157	
<i>ACP</i>	F-CAGCAGGCCAGGTCAGCATT						
	R- GTCGACATGCCAACGCAGGA	236			60	XM_001924222.1	
<i>FASN</i>	F- CGTGGGCTACAGCATGATAG						
	R- GAGGAGCAGGCCGTGTCTAT	108			64	AY954688	
<i>ACP</i>	F-CAGCAGGCCAGGTCAGCATT						
	R- GTCGACATGCCAACGCAGGA	236			60	XM_001924222.1	
<i>ARN S18</i>	F-GGCCTCACTAAACCATCCAA						
	R-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	98			56-64	XM_012100710	

ACACA Acetyl Co-A carboxylase alfa. *SCD*: Esteroil-CoA desaturase. *SREBP1* sterol regulatory element-binding protein 1. *ACP* Acyl transporter protein. *FASN*: Fatty acid synthase. *RNA S18* endogen gene.

ACACA Acetil Co-A carboxilasa alfa). *SCD*: Esteroil-CoA desaturasa. *SREBP1*: Proteína de unión al elemento regulador de estero. *ACP* Proteína transportadora de acilos. *FASN*: Ácido-grasosintasa. *RNA S18*: Gen endógeno.

dissociation curve gave a single peak for each of the samples, confirming the amplification of each gene. No amplification was detected for the negative samples.

Statistical analysis

An analysis of variance was done with variables of nutritional value, total phenols and tocopherol, antioxidant activity and lipidic profile of the *Longissimus dorsi* muscle using a single effect model considering the diets as a fixed effect and comparing means with a Tukey test. Additionally, correlations and linear regression of levels of inclusion of AM and measured variables was done. In accordance to the method used by Benítez *et al.* (2015, 2016), the gene expression data were statistically analyzed for both tissues (*Longissimus dorsi* and liver) following the methodology of Steibel *et al.* (2009), which consists of the analysis of the cycle threshold (Ct) values for target and endogenous genes, simultaneously using a linear mixed model. For this purpose, the following model was used in univariate analysis, of the measurements of gene expression recorded for *ACACA*, *SCD*, *SREBP1*, *ACP* and *FASN*. $y_{gijkr} = \mu + P_j + A_k + W_r + e_{ijkr}$. Where $y_{gijkr} = -\log_2(Eg^{-Ct_{gijkr}})$, Eg provides the PCR efficiency of each gene, Ct ijkr is the value obtained from the thermal cycler software for the gene of the r^{th} well, in the j^{th} qPCR plate, corresponding to the k^{th} animal subjected to the i^{th} treatment. μ is the specific effect of the i^{th} treatment on gene expression. P_j and A_k are the specific random effects on the expression, in the r^{th} qPCR well measured by triplicate in each sample of the gene, in the j^{th} P plate and the k^{th} A pig. e_{ijkr} is the residual effect. Three different μ treatments were considered in the model: dietary effects (three levels: AM0, AM5 and AM10) in finished pigs at 109 ± 4 kg of live weight. To test the differences between the classes in the rate of expression of genes of interest (diffT) data was normalized by the endogenous gene ($\Delta Ct = Ct_{\text{objetivo}} - Ct_{\text{endogeno}}$) and differences between diets and tissues were tested. The values of adjusted statistical probability (p) were calculated using the Bonferroni correction method. To obtain values of change or proportion of fold change (FC) from the diffT estimated values the next equation was applied: $FC = 2^{-\text{diffT}}$. All calculations were done using SPSS, version 20 (2011).

de este análisis fue de 60 °C a 95 °C por 5s. La lectura para la curva de disociación arrojó un solo pico para cada una de las muestras, confirmando la amplificación de cada gen. No se detectó amplificación para las muestras negativas.

Analisis estadístico

Con las variables de la valoración nutricional, tocoferol, fenoles totales, actividad antioxidante y perfil de lípidos del músculo *Longissimus dorsi* se realizó un análisis de varianza, con un modelo de un solo efecto considerando a las dietas como efecto fijo y comparaciones de medias con la prueba de Tukey. Además de correlaciones y regresiones, entre los niveles de inclusión de AM y las variables medidas. De acuerdo a la metodología utilizada por Benítez *et al.* (2015, 2016), se realizaron análisis estadísticos de los datos de expresión génica para ambos tejidos (*Longissimus dorsi* e hígado) siguiendo el método de Steibel *et al.* (2009), que consiste en el análisis de los valores Ct para genes objetivo y endógenos, utilizando simultáneamente un modelo mixto lineal. Para ello se utilizó el siguiente modelo en un análisis univariado, de las mediciones de expresión génica registrada para *ACACA*, *SCD*, *SREBP1*, *ACP* y *FASN*. $y_{gijkr} = \mu + P_j + A_k + W_r + e_{ijkr}$. Donde $y_{gijkr} = -\log_2(Eg^{-Ct_{gijkr}})$, Eg aporta la eficiencia del PCR de cada gen, Ct ijkr es el valor obtenido del software termociclador para el gen del pozo r^{th} , en la j^{th} placa qPCR, correspondiente al k^{th} animal sometido al tratamiento i^{th} . μ es el efecto específico del tratamiento i^{th} en la expresión del gen. P_j y A_k los efectos aleatorios específicos sobre la expresión, en el r^{th} pozo qPCR por triplicado en cada muestra del gen, en la j^{th} P placa y el k^{th} A cerdo. e_{ijkr} es el efecto residual. Se contemplaron tres μ tratamientos diferentes en el modelo: efectos dietéticos (tres niveles: AM0, AM5 y AM10) en cerdos finalizados a los 109 ± 4 kg peso vivo. Para probar las diferencias entre las clases en la tasa de expresión de genes de interés (diffT) normalizados por el gen endógeno ($\Delta Ct = Ct_{\text{objetivo}} - Ct_{\text{endogeno}}$), se realizaron diferentes contrastes entre las dietas y tejidos. Los valores de probabilidad estadística (p) ajustados se calcularon utilizando el método de corrección de Bonferroni. Para obtener valores de cambio o fold change (FC) a partir de los valores diffT estimados, se aplicó la siguiente ecuación: $FC = 2^{-\text{diffT}}$. Todos los cálculos se realizaron utilizando SPSS versión 20 (2011).

Results and Discussion

Proximal chemical composition, γ -tocopherol, the content of total Phenolic Compounds (TPC), antioxidant activity DPPH and ABTS of the *Longissimus dorsi* muscle.

Feeding the experimental diets (AM5 and AM10) to the pigs had a significant ($p < 0.01$) reduction in IMF levels (between 9.7 and 26.6 % reduction) compared to the control diet (AM0) (Table 3). It decreased by -0.21 % for every 1 % inclusion of AM in the diet (Table 4).

Resultados y Discusión

Composición química proximal, γ -tocoferol, contenido de compuestos fenólicos totales (TPC), actividad antioxidante DPPH y ABTS del músculo *Longissimus dorsi*.

La alimentación de los cerdos con las dietas experimentales (AM5 y AM10) tuvo una reducción significativa ($p < 0.01$) en los niveles de IMF (entre 9.7 y 26.6 % de reducción) en comparación con la dieta control (AM0) (Tabla 3). Disminuye en -0.21 % por cada 1 % de inclusión de AM en la dieta (Tabla 4).

Table 3.
Results of the nutritional valuation of muscle *Longissimus dorsi* and presence of antioxidants.

Tabla 3.
Resultados de la valoración nutricional del músculo *Longissimus dorsi* y presencia de antioxidantes.

	AM0	AM5	AM10	EEM	$p <$
Intramuscular fat %	8.10 ^a	7.31 ^{ab}	5.94 ^b	0.46	0.010
Crude protein %	21.20	20.57	20.93	0.29	0.070
Ash %	3.63	3.46	3.56	0.10	0.260
Moisture %	70.83	71.26	71.23	0.38	0.320
γ -tocopherol $\mu\text{g/g}$	7.54 ^b	8.09 ^b	10.98 ^a	0.18	0.001
Total phenols mg AG/100g	1977.04 ^b	2784.31 ^a	3128.86 ^a	159.16	0.006
DPPH $\mu\text{M Trolox/100g}$	339.83 ^b	429.98 ^a	477.16 ^a	11.37	0.001
ABTS $\mu\text{M Trolox/100g}$	751.09 ^b	1158.91 ^a	1054.55 ^a	67.98	0.010

AM: Avocado meal. 0, 5 and 10 %. EEM: Medium standard error. p: Probability value. AG: Gallic acid. ^{ab}Different literals superindicated per row indicatet differences between diets with $p <$ value.

AM: Harina de aguacate. 0, 5 y 10 %. EEM: error estándar medio. p: valor de probabilidad. AG: ácido gálico. ^{ab}Diferentes literales superindicados por fila indican diferencias entre dietas con $p <$ valor.

Table 4.
Regression analysis results of the inclusion of avocado meal on fat and antioxidants present in the *Longissimus dorsi* muscle.

Tabla 4.
Resultados de análisis de regresión de la inclusión de harina de aguacate sobre grasa y antioxidantes presentes en músculo *Longissimus dorsi*.

	b0	b1	r	$p <$
Intramuscular fat %	8.15	-0.21	0.75	0.003
γ -tocopherol $\mu\text{g/g}$	7.15	0.33	0.90	0.001
Total phenols mg AG/100g	2054.16	115.18	0.84	0.001
DPPH $\mu\text{M Trolox/100g}$	346.99	13.73	0.71	0.01
ABTS $\mu\text{M Trolox/100g}$	836.45	30.34	0.60	0.04

b0: Regression interception; b1: Regression; r: Correlation; $p <$: Probability value.

b0: Intercepción de regresión; b1: regresión; r: correlación; $p <$: Valor de probabilidad.

Percentages of protein, ash and moisture were similar in all three diets. There was a significant increase ($p < 0.01$ a $p < 0.001$) in γ -tocopherol, TPC and antioxidant DPPH and ABTS activity in the *Longissimus dorsi* muscle including AM in the diets (Table 3); with a lineal effect in these variables ($p < 0.01$ a $p < 0.001$), for which the content increases with a higher AM inclusion (Table 4).

In commercial pigs, dorsal fat and IMF have decreased, because a very intense selection pressure has been exerted genetically, negatively affecting the organoleptic properties of the meat (Steven *et al.*, 2019; Dzib-Cauich *et al.*, 2020). According to Katsumata (2011), promoting the increase of IMF in pigs is important for meat quality, however, excessive IMFs may be unhealthy for humans. It is considered that IMF is related to the juiciness of the meat, which is currently low in commercial pigs, for which there are studies aimed at modulating the quantity, but also the quality of fatty acids, through the ingredients of the diets (Wood *et al.*, 2008; Wood & Enser, 2017), making an emphasis to explain the lipogenic mechanisms (Katsumata, 2011). An example of manipulation by the IMF is in hams from Iberian pigs, which present above 9.5 % of this, but which diminish to 7.08 % when feed with monounsaturated fatty acids (Jimenez-Colmenero *et al.*, 2010). A similar effect is reported by Hernández-López (2016^b) in Landrace-Yorkshire pigs, where the IMF in *Longissimus thoracis* decreases when fed avocado, with a significant increase in tocopherol; this effect is favored by the nutritional value of avocado (Lemus *et al.*, 2017), and higher antioxidant activity in shell and seed (Tesfay *et al.*, 2010).

Just as tocopherol, phenolic compounds are increased in the meat by feeding pigs with avocado as published by Hernández-López *et al.* (2016^a, 2016^b), improving meat quality and oxidative stability of fats and protein. Tejerina *et al.* (2011), found that acorns have a high antioxidant capacity and healthy fatty acids because they are composed of high tocopherol, phenolic compounds (mainly tannins) and n-9 monounsaturated fatty acids (MUFA); this description is very similar to AM. Avocado is recognized for its potential effects on human health, due to its nutrient composition and antioxidant activity (Méndez-Zúñiga *et al.*, 2019); these nutrients can be used by pigs since avocados discarded due to low weight do not demerit their nutritional properties (Grageola *et al.*, 2010), and it is a fruit that can modulate the quality of

Los porcentajes de proteína, cenizas y humedad se mantuvieron con porcentajes similares en las tres dietas. Significativamente ($p < 0.01$ a $p < 0.001$) se incrementaron los contenidos de γ -tocopherol, TPC, la actividad antioxidante DPPH y ABTS del músculo *Longissimus dorsi* al incluir AM en las dietas (Tabla 3); con un efecto lineal en estas variables ($p < 0.01$ a $p < 0.001$), por lo que es mayor el contenido con nivel de inclusión de AM más alto (Tabla 4).

En cerdos comerciales, la grasa dorsal y la IMF ha disminuido, porque genéticamente se ha ejercido una presión de selección muy intensa, afectando negativamente las propiedades sensoriales de la carne (Steven *et al.*, 2019; Dzib-Cauich *et al.*, 2020). De acuerdo a Katsumata (2011), promover el aumento de IMF en el cerdo es importante para la calidad de la carne, sin embargo, en exceso puede ser no saludable para humanos. Se considera que la IMF está relacionada con la jugosidad de la carne, actualmente en cerdos comerciales es baja, por los que existen estudios con la finalidad de modular su cantidad, pero también la calidad de los ácidos grasos, a través de los ingredientes de las dietas (Wood *et al.*, 2008; Wood & Enser, 2017), tratando de explicar los mecanismos lipogénicos (Katsumata, 2011). Un ejemplo de manipulación de la IMF es en jamones de cerdos Ibéricos, presentan más del 9.5 %, pero sucede que también disminuye a 7.08 %, cuando es alimentado con ácidos grasos monoinsaturados (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2010). Similar efecto reporta Hernández-López (2016^b) en cerdos Landrace-Yorkshire, donde disminuye la IMF en *Longissimus thoracis* al alimentar con aguacate, con aumento del tocoferol significativamente; este efecto es propiciado por el valor nutricional del aguacate (Lemus *et al.*, 2017), y actividad antioxidante más alta en cáscara y semilla (Tesfay *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos al igual que el tocoferol se incrementan en carne, al alimentar cerdos con aguacate, como lo publicó Hernández-López *et al.* (2016^a, 2016^b), mejorando la calidad de la carne y la estabilidad oxidativa de grasas y proteína. Tejerina *et al.* (2011), encuentra que las bellotas tienen una alta capacidad antioxidante y ácidos grasos saludables, por componerse de alto tocoferol, compuestos fenólicos (principalmente taninos) y n-9 MUFA; esta descripción es muy similar a la AM. Al aguacate se le reconocen sus efectos potenciales en la salud humana, por su composición de nutrientes y actividad antioxidante (Méndez-Zúñiga *et al.*, 2019); estos nutrientes pueden ser aprovechados por el cerdo, ya que los aguacates descartados por bajo peso, no demeritan sus propiedades nutricionales (Grageola *et al.*, 2010), y es una fruta que puedes modular la calidad de la carne, de acuerdo

the meat, according to the considerations of Wood *et al.* (2008) and Wood & Enser (2017). Considering also that the apparent digestibility of the nutrients of this type of food is relatively high when offered to pigs (Grageola *et al.*, 2010; Ly *et al.*, 2015; Hernández-López *et al.*, 2016^a).

The use of the whole avocado fruit discarded because of its size and transformed into meal is an interesting alternative for animal feeding, since it is not practical to separate the fruit pulp from the seed and the skin (Grageola *et al.*, 2010), and important nutrients can be used, avoiding environmental pollution with the waste. AM contains a high amount of fat and total energy, with important amounts of proteins and alpha tocopherol, for which give this byproduct of avocado production an interesting perspective in animal feeding (Lemus *et al.*, 2017), by improving meat quality through delaying the oxidation of lipids, in addition to increasing the percentage of mono- and polyunsaturated fatty acids. On the other hand, it is important to consider the high content of tannins that can depress consumption, as reported by Fránquez *et al.* (2017), when feeding avocado paste to pigs. Comparing AM with an acorn of Spanish, brings it closer in nutritional quality and as an alternative for feeding pigs, to produce differentiated meat (Lemus *et al.*, 2017; Rey *et al.*, 2006; Tejerina *et al.*, 2011).

Fatty acids in the *Longissimus dorsi* muscle.

The feeding of the experimental diets that included AM, modified the intramuscular composition of the fatty acids present on the *Longissimus dorsi* muscle (Table 5). Feeding with AM5 showed an important effect in fatty acids compared to the other two diets ($p < 0.05$ a $p < 0.001$); there was an increase in palmitic acid (16:0), palmitoleic (16:1), arachidonic (20:4 n6) and eicosapentaenoic (20:3 n3) while there was a diminishment in stearic (18:0) fatty acids with a higher proportion of 18:1/18:0 (9.66).

By feeding pigs with a higher inclusion, AM10, the most noticeable effect on the measurement of saturated fatty acids is the decrease of palmitic (C16:0), which is usually the most abundant in pork (Wood & Enser, 2017). The contents of arachidic (20:0) and linoleic (18:2 n6) fatty acids increased, with a higher proportion of PUFA and PUFA/SFA and PUFA/MUFA ratios ($p < 0.01$ a $p < 0.001$). There was no significant effect on MUFA/SFA relationship or in oleic acid (18:1) content by inclusion of AM.

a las consideraciones de Wood *et al.* (2008) y Wood & Enser (2017). Considerando además que la digestibilidad aparente de los nutrientes, de este tipo de alimento es relativamente alta, cuando se ofrece a los cerdos (Grageola *et al.*, 2010; Ly *et al.*, 2015; Hernández-López *et al.*, 2016^a).

El uso de la fruta entera de aguacate descartada por su tamaño y transformada en harina, es una alternativa interesante para la alimentación animal, ya que no es práctico la separación de la pulpa de la fruta de la semilla y la cáscara (Grageola *et al.*, 2010), y se pueden utilizar nutrientes importantes, evitando con los desechos contaminar el medio ambiente. La harina de aguacate contiene un alto contenido de grasa y de energía total, con cantidades no despreciables de proteína y alfa tocoferol, lo que hacen de este subproducto del aguacate, una perspectiva en la alimentación animal (Lemus *et al.*, 2017), al mejorar la calidad de la carne a través de retardar la oxidación de los lípidos, además de incrementar el porcentaje de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Por otro lado, es importante considerar el alto contenido de taninos que pueden deprimir su consumo, como lo reporta Fránquez *et al.* (2017), al alimentar cerdos con pasta de aguacate. Comparando la AM con bellota de española, lo acerca en calidad nutricional y como alternativa para la alimentación de cerdos, para producir carne diferenciada (Lemus *et al.*, 2017; Rey *et al.*, 2006; Tejerina *et al.*, 2011).

Ácidos grasos del músculo *Longissimus dorsi*.

La alimentación con las dietas experimentales que incluyeron AM, modificó la composición de los ácidos grasos presentes en la IMF del músculo *Longissimus dorsi* (Tabla 5). Al alimentar con AM5 mostró un efecto importante en los ácidos grasos, en relación a las otras dos dietas ($p < 0.05$ a $p < 0.001$); aumentaron los ácidos grasos palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), araquidónico (20:4 n6) y eicosapentaenoico (20:3 n3), mientras que disminuyó el ácido esteárico (18:0) con una relación 18:1/18:0 mayor (9.66).

Al alimentar los cerdos con mayor inclusión AM10, los efectos más notorios en la medición de ácidos grasos saturados, es la disminución de palmítico (C16:0), el cual suele ser el más abundante en la carne de cerdo (Wood & Enser, 2017). Los contenidos de ácidos grasos araquídico (20:0) y linoleico (18:2 n6) aumentaron, con mayor proporción de PUFA y de las relaciones PUFA/SFA y PUFA/MUFA ($p < 0.01$ a $p < 0.001$). No se observó efecto significativo en la relación MUFA/SFA y en ácido oleico (C18:1) al incluir AM.

Duran-Monge *et al.* (2008) cuando adicionaron en la dieta cerca de 10 % de aceite de girasol, de linaza o

Table 5.
Muscle *Longissimus dorsi* intramuscular fatty acids profile (%) according to the feeding level of pigs with avocado meal.

Tabla 5.
Perfil de ácidos grasos (%) intramuscular del músculo *Longissimus dorsi* de acuerdo al nivel de alimentación de los cerdos con harina de aguacate.

	Fatty acids	AM0	AM5	AM10	EEM	p <
C14:0	Myristic	1.66	1.95	1.63	0.09	.272
C15:0	Pentadecilic	0.34	0.21	0.18	0.04	.244
C16:0	Palmitic	23.47 ^{ab}	24.72 ^a	21.93 ^b	0.49	.050
C17:0	Margaric	0.33	0.28	0.26	0.02	.191
C18:0	Stearic	7.01 ^a	5.03 ^b	6.66 ^a	0.29	.001
C20:0	Arachidic	0.32 ^b	0.34 ^b	0.45 ^a	0.02	.008
	∑ Saturated fatty acids	33.14	32.55	31.12	0.51	0.276
SFA						
C14:1	Miristoleic	0.16	0.26	0.24	0.03	0.323
C15:1	Pentadecilic cis-10	1.07	0.62	0.83	0.09	0.140

AMA: Avocado meal. 0, 5 y 10 %. EEM: Medium standard error. *p*: Probability value. ^{ab}Different literals superindicated per row indicate differences between diets with *p* < value.

AMA: Harina de aguacate. 0, 5 y 10 %. EEM: error estándar medio. *p*: valor de probabilidad. ^{ab}Diferentes literales superindicados por fila indican diferencias entre dietas con *p* < valor.

Duran-Monge *et al.* (2008) when adding about 10 % sunflower oil, flaxseed oil or fish oil/linseed combination to the diet, also found a decrease in *Longissimus muscle*, palmitoleic(C16:1), stearic (C18:0), oleic (C18:1) and total MUFA. Similar results were found by Hernández-López *et al.* (2016^b) when the avocado paste was included in the diet, palmitoleic acid (C16:1) and the sum value of saturated fatty acids (SFA) were decreased, with no effect on oleic acid (C18:1). When acorn-fed pigs according to Rey *et al.* (2006) and Jimenez-Colmenero *et al.* (2010), maintain values >49 % of oleic acid (C18:1) and >57 % of MUFA. An important effect is that with AM, oleic acid (C18:1) did not decrease by 48 %, which is the case with Duran-Monge *et al.* (2008), who report <38 % with food sources rich in oleic and unsaturated fatty acids.

As in this research when fed AM10, linoleic acid (C18:2) was also increased by providing diets with sunflower or flaxseed oil in the research by Duran-Monge *et al.* (2008); the same happened with diets containing avocado paste (Hernández-López *et al.*, 2016^b). The increase in the total proportion of PUFA in AM10, did not reach critical values of 15 %, percentage from which begin to present problems of soft and oily fats or "floppy meat" occurs (Wood *et al.*, 2004). The balance in the diet

combinación aceite de pescado-linaza, también encontraron una disminución en músculo *Longissimus*, de ácidos grasos palmitoleico(C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y monoinsaturados totales. Similares resultados encontraron Hernández-López *et al.* (2016^b) al incluir pasta de aguacate en la dieta, disminuyó el ácido palmitoleico (C16:1) y el valor de la suma de ácidos grasos saturados (SFA), sin efecto en ácido oleico (C18:1). Cuando se alimenta cerdos con bellota de acuerdo a Rey *et al.* (2006) y Jiménez-Colmenero *et al.* (2010), mantiene valores >49 % de ácido oleico (C18:1) y >57 % de ácidos grasos monosaturados. Un efecto importante es que con AM no disminuyó el ácido oleico (C18:1) del 48 % lo que si sucede con Duran-Monge *et al.* (2008), que reportan <38 % con fuentes alimenticias ricas en oleico e insaturados.

Al igual que en esta investigación cuando se alimentó con AM10, el ácido linoleico (C18:2) también se incrementó, al proporcionar dietas con aceite de girasol o linaza en la investigación de Duran-Monge *et al.* (2008); lo mismo sucedió con la dieta que contenía pasta de aguacate (Hernández-López *et al.*, 2016^b). El incremento de la proporción total de PUFA en AM10, no llegó a valores críticos de 15 %, concentración a partir de la cual empiezan a presentarse problemas de grasas blandas y aceitosas o "floppy meat" (Wood *et al.*, 2004). El equilibrio en la dieta determina el equilibrio en los tejidos, la composición del

determines the balance in the tissues, the composition of the fatty acid stored in the adipose tissues, reflects a great extent that of the ingested lipids (Wood *et al.*, 2008).

The PUFA/SFA ratio is beneficial, with 0.45 % in this study when feeding AM10, it is slightly above that recommended by nutritionists, which should be greater than 0.40 %. The high proportion of PUFA is not necessarily healthy if it is not in an adequate proportion with the ratio n6/n3 (Fernández *et al.*, 2007). Considerations of Jiménez-Colmenero *et al.* (2010) indicate that there are some cases of Iberian hams in which they do exceed this value of 0.4 % PUFA/SFA, in these cases the pigs had been fed with corn oil or supplemented with MUFA and n3. Hernández-López *et al.* (2016^b) report that pigs fed with avocado paste possessed a PUFA/SFA relation of 0.26 % in the *Longissimus dorsi* muscle; Rey *et al.* (2006) quantified 0.13 % in the *Longissimus dorsi* muscle feeding with acorn, Fernández *et al.* (2007) reported values of 0.19-0.30 in Iberic pigs, and Duran-Monge *et al.* (2008) 0.78 in *Longissimus* muscle feeding with linseed and 0.82 with sunflower oil. Benítez *et al.* (2015), show an increase of PUFA/SFA relation comparing diets with PUFA (0.16) against SFA (0.08) supplemented diets.

Gene expression in *Longissimus dorsi* muscle and liver.

As observed in Table 6, the FC of the *Longissimus dorsi* muscle and liver show differences when compared ($p < 0.001$); situation predicted according to the reports of several researchers, pointing out that the expression is different according to the tissue and feeding (Duran-Mongé *et al.*, 2009^a, 2009^b; Benítez *et al.*, 2015; Benítez *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

With the AM5 diet in contrast to AM0, the content of mRNA expression in the *Longissimus dorsi* muscle was higher in all five genes ($p < 0.001$). For liver tissue, only the *ACACA* and *SCD* genes had differences, with a higher expression for AM5 in contrast to AM0 ($p < 0.001$).

When fed AM10 is compared with the control diet AM0, similar effects occurred in both tissues; there is no difference in the expression of *SREBP1*, but it decreases, as well as the rest of the genes where it was significant ($p < 0.01$).

ácido graso almacenado en los tejidos adiposos, refleja en gran medida la de los lípidos ingeridos (Wood *et al.*, 2008).

La relación PUFA/SFA es benéfica, con 0.45 % en este estudio al alimentar con AM10, está un poco arriba de la recomendada por los nutricionistas, que debe ser mayor de 0.4 %. La alta proporción de PUFA no necesariamente es saludable, si no está en una proporción adecuada con la relación n6/n3 (Fernández *et al.*, 2007). Consideraciones de Jiménez-Colmenero *et al.* (2010) indican que hay algunos casos de jamones ibéricos en los que sí rebasan este valor de 0.4 PUFA/SFA, en estos casos los cerdos han sido alimentados, con aceite de maíz o con suplementos de ácidos grasos monoinsaturados y n3. Hernández-López *et al.* (2016^b) reportan que cerdos alimentados con pasta de aguacate, cuantificaron en el músculo *Longissimus dorsi* una relación PUFA/SFA de 0.26; Rey *et al.* (2006) cuantificaron 0.13 en el músculo *Longissimus dorsi* alimentando con bellota, Fernández *et al.* (2007) en cerdos ibéricos reportaron valores entre 0.19-0.30, Duran-Monge *et al.* (2008) reportaron una relación PUFA/SFA 0.78 en músculo *Longissimus*, alimentando con aceite de linaza y de 0.82 con aceite de girasol. Benítez *et al.* (2015), muestran un aumento de la relación PUFA/SFA, al comparar dietas poliinsaturadas (0.16) contra saturadas (0.08).

Expresión de genes en el músculo *Longissimus dorsi* e hígado.

Como se observa en la tabla 6, en el músculo *Longissimus dorsi* e hígado, los FC muestran diferencias en las diferentes comparaciones ($p < 0.001$); situación prevista de acuerdo con los reportes de diversos investigadores, al señalar que la expresión es diferente de acuerdo al tejido y alimentación (Duran-Mongé *et al.*, 2009^a, 2009^b; Benítez *et al.*, 2015; Benítez *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

Con la dieta AM5 en contraste con AM0, el contenido de expresión de mRNA en el músculo *Longissimus dorsi* fue mayor en los cinco genes ($p < 0.001$). En cuanto al tejido del hígado solo los genes *ACACA* y *SCD* tuvieron diferencias, con mayor expresión para AM5 en contraste con AM0 ($p < 0.001$).

Cuando se alimenta con AM10 al compararse con la dieta control AM0, en ambos tejidos sucedieron efectos similares; no hay diferencias en la expresión de *SREBP1*, pero disminuye, igual que la del resto de los genes donde si fue significativa ($p < 0.01$).

Table 6.
Fold Change (FC =2^{-diffT}) of gene expression in muscle
Longissimus dorsi and liver according to the contrast of diets.

Tabla 6.
Fold Change (FC =2^{-diffT}) de la expresión de genes en el músculo
Longissimus dorsi e hígado de acuerdo al contraste de las dietas.

Contrast	ACACA	SCD	SREBP1	ACP	FASN
AM5Ld-AM0Ld	1.13*	1.15*	1.18*	1.08*	1.10*
AM5Hi-AM0Hi	1.14*	1.11*	1.02 ^{ns}	1.00 ^{ns}	1.01 ^{ns}
AM10Ld-AM0Ld	0.83*	0.80*	0.77 ^{ns}	0.88*	0.86*
AM10Hi-AM0Hi	0.85*	0.77*	0.93 ^{ns}	0.87*	0.83*

AM: Avocado meal. 0 (0 % control). 5 (5 %). 10 (10 %). Ld: *Longissimus dorsi*; Hi (Liver). Probability value: * $p < 0.001$. ns: no significative. ACACA Acetyl Co-A carboxylase alfa. SCD: Estearoil-CoA desaturase. SREBP1sterol regulatory element-binding protein 1. ACP Acyl transporter protein. FASN: Fatty acid synthase.

AM: Harina de aguacate. 0 (control del 0 %). 5 (5 %). 10 (10 %). Ld: *Longissimus dorsi*; Hi (hígado). Valor de probabilidad: * $p < 0.001$. ns: no significativo. ACACA Acetil Co-A carboxilasa alfa). SCD: Estearoil-CoA desaturasa. SREBP1: Proteína de unión al elemento regulador de esterol. ACP Proteína transportadora de acilos. FASN: Ácido-grasosintasa.

With the AM5 diet the high expression of lipogenic genes (ACACA, ACP and FASN), as reported in the literature (Li *et al.*, 2020; Fernández *et al.*, 2017), can be associated with the increase of arachidonic (20:4 n6) and eicosapentaenoic (20:3 n3) acids, for the effects of biogenesis of long-chain fatty acids (see Table 5). Meanwhile, the esterification of fatty acids (SCD), can be associated with the decrease of stearic acid (18:0) and increase in the 18:1/18:0 relationship. SCD has been associated with the catalytic synthesis of MUFA (palmitoleic and oleic acids) using SFA as substrates (palmitic and stearic acids) (Fernández *et al.*, 2017).

Feeding with AM5 diet in contrast to AM0, in *Longissimus dorsi* was expressed more the biogenesis of long-chain fatty acids and esterification of fatty acids. The higher expression of SREBP1 in the *Longissimus dorsi* muscle and not in the liver for this AM5 diet indicates that there was an association between this gene and the rest of those evaluated in muscle. We do not agree with Duran-Mongé *et al.* (2009^b) who found differences in tissue expression, but expressing more ACACA and SREBP1 in the liver, with more SCD and FASN in adipose tissue.

The situation was the opposite when feeding AM10 since this diet decreased the expression of the genes studied, a situation similar to that pointed out by Mohan *et al.* (2012), who reported that the expression of the important lipogenic mediator SREBP1, can be affected by the type of diet, as it happened in the AM10 diet, where it is not overexpressed.

Con la dieta AM5 la expresión alta de genes lipogénicos (ACACA, ACP y FASN), de acuerdo a lo reportado en la literatura (Li *et al.*, 2020; Fernández *et al.*, 2017), se puede asociar al aumento de los ácidos araquidónico (20:4 n6) y eicosapentaenoico (20:3 n3), por efectos de biogénesis de los ácidos grasos de cadena larga (ver Tabla 5). Mientras que, la esterificación de ácidos grasos (SCD), se puede asociar a la disminución de ácido esteárico (18:0) y aumento de una relación 18:1/18:0. Se ha asociado a la SCD con catalizar la síntesis de MUFA (ácidos palmitoleico y oleico) a partir de SFA (ácidos palmítico y esteárico) (Fernández *et al.*, 2017).

Alimentar con dieta AM5 en contraste de AM0, en *Longissimus dorsi* se expresó más la biogénesis de los ácidos grasos de cadena larga y la esterificación de ácidos grasos. La mayor expresión de SREBP1 en el músculo *Longissimus dorsi* y no en hígado para esta dieta AM5, indica que existió una asociación entre este gen y el resto de los evaluados en músculo. No se concuerda con Duran-Mongé *et al.* (2009^b) que encontraron diferencias de expresión en los tejidos, pero expresando más ACACA y SREBP1 en hígado, con más SCD y FASN en tejido adiposo.

La situación fue contraria al alimentar con AM10, ya que disminuyó la expresión de los genes estudiados, situación similar a la que señalan Mohan *et al.* (2012), al reportar que la expresión del importante mediador lipogénico SREBP1, puede afectarse por el tipo de dieta, como sucedió en la

The diet with sunflower oil according to Mohan *et al.* (2012) and Benitez *et al.* (2018) also decreases the expression of *FASN*, *SCD* and *SREBP1*; the reduction of *SREBP1* can be due to the increase of n-6 PUFA, which in turn reduces the expression of *FASN* and *SCD*. In researches such as those by Duran-Montg e *et al.* (2009^a, 2009^b) it was observed that the expression of *FASN* and *SCD* genes were considerably reduced in liver and muscle of pigs fed with PUFA, as it happened in this work when AM was increased to 10 % (AM10). The lower activity of these lipogenic enzymes in muscle has already been demonstrated in pigs and can be related to the low amounts of fat in the muscle (Guillevic *et al.*, 2009).

In this research, IMF was decreased by including more AM level in the diet (see Tables 3 and 4), but nutritionally it is important, that there was an increase in the proportions of PUFA and arachidic (20:0) and linoleic (18:2 n6) long-chain fatty acids to higher AM conditions; considering the publications by Wood *et al.* (2008) and Wood & Enser (2017),) the incorporation of long chain fatty acids in the feed is probable through the AM proportionated. On the other hand, according to Li *et al.* (2020), there are other genes such as the peroxisome proliferation-activated receptors (PPARs) that regulate the expression of genes involved in lipidic metabolism, which could influence the results and were not incorporated for analysis in this research.

In relation to diets without incorporating fat, Duran-Mong e *et al.* (2009^a) reported that pigs had a higher expression of genes involved in stearic synthesis (*ACACA* and *FASN*), and also of the gene involved in desaturation (*SCD*); the same happened when comparing the AM0 diet against AM10 (with lower expression), nevertheless, the synthesis of long-chain fatty acids is not increased in the AM0 diet. According to the results of Wang *et al.* (2020), the increase of *FASN* in AM0 diet, could influence in greater IMF deposition, since it is a predictor of the IMF content in the *Longissimus dorsi* muscle in Laiwu pigs.

Muñoz *et al.* (2007) point out that in Iberian pigs *ACACA* is a good predictor, its overexpression is related to the increase and content of monounsaturated fatty acids (palmitoleic, vaccenic and oleic), reducing the percentage of stearic acid; when fed AM5 this effect happens when the stearic acid decreases and the palmitoleic acid

dieta AM10, donde no se sobre expresa. La dieta con aceite de girasol de acuerdo con Mohan *et al.* (2012) y Benitez *et al.* (2018) también disminuye la expresión de *FASN*, *SCD* y *SREBP1*; la reducción de *SREBP1* sealanaron que puede deberse al aumento de n-6 PUFA, que a su vez reduce la expresión de *FASN* y *SCD*. En investigaciones como las de Duran-Montg e *et al.* (2009^a, 2009^b) se observó que la expresión de los genes *FASN* y *SCD*, se redujeron considerablemente en hígado y músculo de cerdos alimentados con PUFA, como sucedió en este trabajo, cuando se incrementó la AM al 10 % (AM10). La menor actividad de estas enzimas lipogénicas en el músculo, ya se ha demostrado en el cerdo, y pueden estar relacionadas con la baja cantidad de grasa en el músculo (Guillevic *et al.*, 2009).

En esta investigación disminuyó la IMF al incluir más nivel de AM en las dietas (ver Tablas 3 y 4), pero es importante nutricionalmente, que se presentó un aumento en las proporciones de PUFA y ácidos grasos de cadena larga araqu idico (20:0) y linoleico (18:2 n6) a mayor AM; considerando las publicaciones de Wood *et al.* (2008) y Wood & Enser (2017), es probable la incorporación de ácidos grasos de cadena larga a través del alimento con AM proporcionado. Por otro lado, de acuerdo con Li *et al.* (2020), existen otros genes como el grupo de los Receptores Activadores de la Proliferación de Peroxisoma (*PPARs*) que regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, que pudieron influir en los resultados y que no fueron incorporados para su análisis en este estudio.

En relación a dietas sin incorporar grasas, Duran-Mong e *et al.* (2009^a) reportaron que, los cerdos presentaron una expresión más alta de los genes involucrados en la síntesis de esteárico (*ACACA* y *FASN*), y también del gen involucrado en la desaturación (*SCD*); esto mismo sucedió al comparar la dieta AM0 contra AM10 (con menor expresión), sin embargo, no se incrementa en la dieta AM0 la síntesis de ácidos grasos de cadena larga. De acuerdo a los resultados de Wang *et al.* (2020), el aumento de *FASN* en dieta AM0, pudo influir en mayor deposición de IMF, ya que es un predictor del contenido de IMF en el músculo *Longissimus dorsi* en cerdos Laiwu.

Muñoz *et al.* (2007) sealan que en cerdos ibéricos *ACACA* es un buen predictor, su sobre expresión está relacionada al incremento y el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (palmitoleico, vacc nico y oleico), reduciendo el porcentaje de ácido esteárico; cuando se aliment  con AM5 sucede este efecto al disminuir el ácido

increases, but it does not happen in AM10, since it had a low expression of this gene.

Considering the obtained results and the consulted literature, it can be considered that feeding pigs with AM, influenced the IMF, the presence of antioxidants and the modulation of lipids in *Longissimus dorsi*, with different gene expression in tissues such as the *Longissimus dorsi* and liver.

Conclusion

Including avocado meal in the diet of pigs lineally diminished the intramuscular fat in the *Longissimus dorsi* muscle with lineal increases of γ -tocopherol, total phenolic compounds, and antioxidant ABTS and DPPH effects. Feeding with AM10 complementation increased the arachidic (20:0), linoleic (18:2 n6) fatty acids, PUFA, PUFA/SFA and PUFA/MUFA. Feeding with AM5 complementation in contrast to control, increased the mRNA expression of *ACACA*, *SCD*, *ACP*, and *FASN* in the *Longissimus dorsi* muscle. With the AM10 in contrast to control, there was a diminishment of *ACP*, *ACACA*, *FASN* and *SCD* in both the *Longissimus dorsi* muscle and liver.

References

- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1997). Official methods of analysis (15th ed.). USA.
- Benítez, R., Núñez, Y., Fernández, A., Isabel, B., Fernández, A. I., Rodríguez, C. and Óvilo, C. (2015). Effects of dietary fat saturation on fatty acid composition and gene transcription in different tissues of Iberian pigs. *Meat Science*, 102: 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.12.005>
- Benítez, R., Núñez, Y., Fernández, A., Isabel, B., Rodríguez, C., Daza, A., López-Bote, C., Silió, L. and Óvilo, C. (2016). Adipose tissue transcriptional response of lipid metabolism genes in growing Iberian pigs fed oleic acid v. carbohydrate enriched diets. *Animal*, 10(6): 939-46. <https://doi.org/10.1017/S1751731115003055>
- Benítez, R., Fernández, A., Isabel, B., Núñez, Y., De Mercado, E., Gómez-Izquierdo, E., García-Casco, J., López-Bote, C. and Óvilo, C. (2018). Modulatory Effects of Breed, Feeding Status, and Diet on Adipogenic, Lipogenic, and Lipolytic Gene Expression in Growing Iberian and Duroc Pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(22): 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms19010022>
- Can-Cauich, C. A., Sauri-Duch, E., Moo-Huchin, V. M., Betancur-Ancona, D. and Cuevas-Glory, L. F. (2019). Effect of extraction method and specie on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of pumpkin oil from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 285: 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.153>
- Duran-Montgé, P., Realini, C. E., Barroeta, A. C., Lizardo, R. and Esteve-Garcia, E. (2008). Tissue fatty acid composition of pigs fed different fat sources. *Animal*, 2: (12): 1753-1762. <https://doi.org/10.1017/S1751731108003169>
- Duran-Montgé, P., Theil, P. K., Lauridsen, C. and Esteve-Garcia, E. (2009^a). Dietary fat source affects metabolism of fatty acids in pigs as evaluated by altered expression of lipogenic genes in liver and adipose tissues. *Animal*, 3(4): 535-542. <https://doi.org/10.1017/S1751731108003686>

esteárico y aumentar el ácido palmitoleico, pero no sucede en AM10, ya que tuvo baja expresión.

Considerando los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, se puede considerar que alimentar con harina de aguacate a los cerdos, influyó sobre la IMF, presencia de antioxidantes y modulación de los lípidos en el *Longissimus dorsi*, con diferente expresión de genes en los tejidos *Longissimus dorsi* e hígado.

Conclusión

Al incluir en la alimentación de los cerdos la AM disminuyó linealmente la IMF en el músculo *Longissimus dorsi*, con aumentos lineales de γ -tocoferol, compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante ABTS y DPPH. Al alimentar con AM10, aumentaron los ácidos grasos araquídico (20:0), linoleico (18:2 n6), PUFA, PUFA/SFA y PUFA/MUFA. Alimentar con dieta AM5 en contraste de AM0, en *Longissimus dorsi* hubo **más** expresión de mRNA de *ACACA*, *SCD*, *ACP*, y *FASN*. Con la dieta AM10 en contraste de AM0, la expresión de mRNA de *ACP*, *ACACA*, *FASN* y *SCD* fueron menores en *Longissimus dorsi* e hígado.

- Duran-Montgé, P., Theil, P. K., Lauridsen, C. and Esteve-Garcia, E. (2009^b). Fat metabolism is regulated by altered gene expression of lipogenic enzymes and regulatory factors in liver and adipose tissue but not in semimembranosus muscle of pigs during the fattening period. *Animal*, 3(11): 1580-1590. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990450>
- Dzib-Cauich, D., Lemus-Flores, C., Bugarín-Prado, J. O., Ayala-Valdovinos, M. A. and Moo-Huchin, V. M. (2020). Perfil de ácidos grasos en músculo *Longissimus dorsi* y expresión de genes asociados con metabolismo lipídico en cerdos pelón mexicanos y cerdos Landrace-Yorkshire. *Livestock Research for Rural Development*, 32(115): 1-8. <http://www.lrrd.org/public-lrrd/proofs/lrrd3207/clemu32115.html>
- Fernández, M., Ordóñez, J. A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C. and de la Hoz, L. (2007). Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 101: 107-112. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.006>
- Fernández, A. I., Óvilo, C., Barragán, C., Rodríguez, M. C., Silió, L., Folch, J. M. and Fernández, A. (2017). Validating porcine SCD haplotype effects on fatty acid desaturation and fat deposition in different genetic backgrounds. *Livestock Science*, 205: 98–105. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.021>
- Fránquez, P., Rodríguez, G., Lemus, C., Grageola, F. and Ly, J. (2017). Performance traits and índices of the intake pattern of fattened pigs with fresh paste of whole avocado. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(3): 329-336. <http://cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/755>
- Grageola, F., Sangines, L., Díaz, C., Gómez, A., Cervantes, M., Lemus, C. and Ly, J. (2010). The effect of breed and dietary level of avocado fat on the N and energy balance in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 19(1): 37-48. <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/293/1/The%20effect%20of%20breed%20and.pdf>
- Guillevic, M., Maryline, K. and Jacques, M. (2009). Effect of a linseed diet or a sunflower diet on performances, fatty acid composition, lipogenic enzyme activities and stearoyl-CoA-desaturase activity in the pig. *Livestock Science*, 124(1-3): 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.02.009>
- Hanson, S. W. F. and Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenate. *Biochemistry Journal*, 89: 101-102.
- He, Y., Wang, K. and Wang, L. (2010). Effect of α -tocopherol and β -carotene supplementation on meat quality and antioxidant capacity of pigs fed high-linseed oil diet. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 20(3): 180-188. <http://www.thejaps.org.pk/docs/Sep-2010/EFFECT-TOCOPHEROL.pdf>
- Hernández-López, S. H., Rodríguez-Carpena, J. G., Lemus-Flores, C., Galindo-García, J. and Estévez, M. (2016^a). Antioxidant protection of proteins and lipids in processed pork loin chops through feed supplementation with avocado. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6): 2788–2796. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2252-6>
- Hernández-López, S. H., Rodríguez-Carpena, J. H., Lemus-Flores, C., Grageola-Núñez, F. and Estévez, M. (2016^b). Avocado waste for finishing pigs: Impact on muscle composition and oxidative stability during chilled storage. *Meat Science*, 116(6): 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.018>
- Jiménez-Colmenero, F., Ventanas, J. and Toldrá, F. (2010). Review: Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science*, 84: 585-593. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.029>
- Katsumata, M. (2011). Review: Promotion of intramuscular fat accumulation in porcine muscle by nutritional regulation. *Animal Science Journal*, 82: 17-25. <http://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00844.x>
- Lemus, C., Bugarín, J., Grageola, F., Rodríguez, J. G., Mejía, K. and Valdivia, R. (2017). Características químicas de la pasta de aguacate Hass fruto completo (Persea americana Mill) mexicano de Nayarit destinado a la alimentación animal. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 24(2): 112-118. <http://www.iip.co.cu/RCP/242/06%20CLemus.pdf>
- Li, Z., Lu, S., Cui, K., Shafique, L., Rehman, S. U., Luo, C., Wang, Z., Ruan, J., Qian, Q., and Liu, Q. (2020). Fatty acid biosynthesis and transcriptional regulation of Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) in buffalo milk. *BMC genetics*, 21(1): 23. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-0829-6>
- Ly, J., Bugarín, J., Alonso-Spillbury, M. I., Rodríguez, J. G., Orozco, V. and Lemus, C. (2015). Uso de la técnica de la bolsa de nylon móvil para medir digestibilidad in situ de algunos insumos y aguacate en cerdos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 18(2): 221-229. <http://www.redalyc.org/articulo.0.00?id93941388008>

- Méndez-Zúñiga, S. M., Corrales-García, J. E., Gutiérrez-Grijalva, E. P., García-Mateos, R., Pérez-Rubio, V. and Basilio, H. J. (2019). Fatty Acid Profile, Total Carotenoids, and Free Radical-Scavenging from the Lipophilic Fractions of 12 Native Mexican Avocado Accessions. *Plant Foods Human Nutrition*, 74: 501–507. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00766-2>
- Mohan, N., Harihara, I., Babul, C., Madan, K., Anubrata, D. and Kalita, D. (2012). Effect of dietary sunflower oil and coconut oil on adipose tissue gene expression, fatty acid composition and serum lipid profile of grower pigs, *Archives of Animal Nutrition*, 66(4): 271-282, <https://doi.org/10.1080/1745039X.2012.683324>
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas, M. L., Betancur-Ancona, M. L. and Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152(1): 508-515. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.12.013>
- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964) Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride-Methanol. *Journal of Lipid Research*, 5: 600-608. <https://www.jlr.org/content/5/4/600.full.pdf+html>
- Muñoz, G., Alves, E., Fernández, A., Ovilo, C., Barragán, C., Estellé, J., Quintanilla, R., Folch, J. M., Silió, L., Rodríguez, M. C. and Fernández, A. I. (2007). QTL detection on porcine chromosome 12 for fatty-acid composition and association analyses of the fatty acid synthase, gastric inhibitory polypeptide and acetyl-coenzyme A carboxylase alpha genes. *Animal Genetic*, 38(6): 639-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01668.x>
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos. - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=764738&fecha=18/06/2001
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C. and López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, 73(1): 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.10.018>
- SPSS. (2011). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M. and Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, 94(2): 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008>
- Steven L. M., David G. T. and Dennis N. M. (2019). Chapter 5 Fat and fat cells in domestic animals. *The Science of Animal Growth and Meat Technology (Second Edition)*. Academic Press, Iowa State University. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815277-5.00005-6>
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M. and Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry*, 124:997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.058>
- Tesfay, S. Z., Bertling, I. and Bower, J. P. (2010). Anti-oxidant levels in various tissues during the maturation of ‘Hass’ avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(2): 106-112. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512639>
- Wang, H., Jin, W., Dan-dan, Y., Zong-li, L., Yong-qing, Z. and Wei, C. (2020). Expression of lipid metabolism genes provides new insights into intramuscular fat deposition in Laiwu pigs. *Asian-Australas Journal Animal Science*, 33(3): 390-397. <https://doi.org/10.5713 / ajas.18.0225>
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R. and Enser M. (2004). Review: Effects of fatty acids on meat quality. *Meat Science*, 66(1): 21-32. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00022-6)
- Wood J. D., Enser, M., Fisher A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I. and Whittington, F. M. (2008). Review: Fat deposition, fatty acid composition and meat quality. *Meat Science*, 78: 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>
- Wood J. D & M. Enser. (2017). New aspects of meat quality. Chapter 20. Manipulating the Fatty Acid Composition of Meat to Improve Nutritional Value and Meat Quality. Elsevier Ltd. University of Bristol, Bristol, United Kingdom. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100593-4.00023-0>