

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**ACIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) Y RESPUESTA INFLAMATORIA EN
CERDOS CON EL VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTIVO Y
RESPIRATORIO PORCINO**

POR:

JUDITH ROSARIO PERALTA QUINTANA

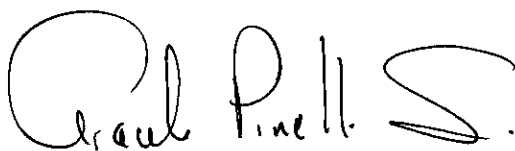
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

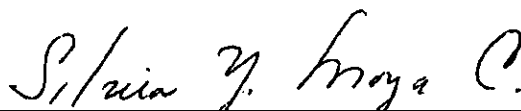
DICIEMBRE DE 2010

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Judith Rosario Peralta Quintana, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Araceli Pinelli Saavedra

Directora de Tesis



Dra. Silvia Yolanda Moya Gamarena



Dr. Jesús Hernández

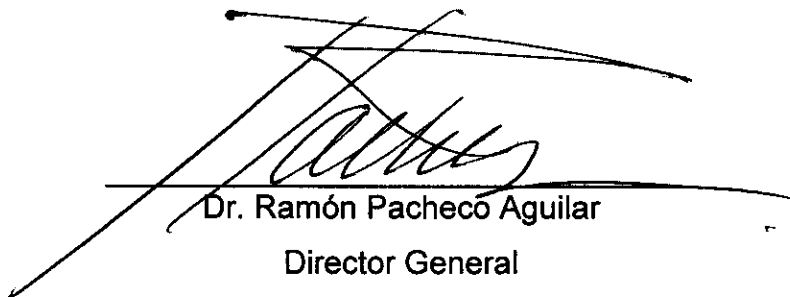


Dra. Verónica Mata Haro

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco infinitamente a Dios por haberme permitido llegar a este día y por todo lo que me ha dado.

A mis padres, por el esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado en el transcurso de mi vida y mis estudios; a mis hermanos, abuelos y tíos agradezco también su apoyo porque han sido una fuente de estímulo en todo momento.

A mi asesora y Directora de Tesis, Doctora Araceli Pinelli, que con sus conocimientos, experiencia y acertada colaboración me dirigió en la realización de este trabajo. Gracias por su paciencia y apoyo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por darme la oportunidad de conocer a través de sus investigadores el ambiente de la investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto y la beca otorgada.

Al Doctor Jesús Hernández, Doctora Verónica Mata y Doctora Silvia Moya por compartir sus conocimientos y experiencia.

A los muchachos del laboratorio Ericka, Jesús Sosa, Lily, Karina, Lupita, Maricela, Alexel, Mónica y a Rebeca por el apoyo técnico.

A mis amigos y todos aquellos que me brindaron sus buenos deseos durante la realización de este trabajo.

FINANCIAMIENTO CONACYT

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Fondos Sectoriales de Investigación Ciencia Básica SEP-CONACYT Contrato de No. 24379-50724-Z.

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a mi querida familia, especialmente a mis padres Sergio Alfonso y María Elena, quienes han hecho todo lo posible por ver a sus hijos realizados como profesionistas, sepan que su esfuerzo hoy ha rendido fruto y que este logro también es de ustedes.

¡Los quiero mucho!

Su hija Rosario

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	3
2.2. Propiedades Biológicas	3
2.3. Acción Inmunomoduladora del CLA: Producción de Citocinas	4
2.4. Mecanismos de Regulación del Sistema Inmune por el CLA	7
2.4.1. Modulación Dependiente de Eicosanoides	7
2.4.2. Modulación Dependiente del PPAR	9
2.5. PRRSV: Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino	10
2.5.1. Agente Etiológico	10
2.5.2. Manifestaciones Clínicas	11
2.5.3. Impacto en la Producción Porcina	12
2.6. Respuesta Inmune Frente al PRRSV	12
2.6.1. Respuesta Humoral	12
2.6.2. Inmunidad Celular	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo General	17
5.2. Objetivos Particulares	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Diseño Experimental	18
6.2. Extracción de Células Mononucleares (CMN)	20
6.3. Cultivo Celular	21
6.4. Detección de las Citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α por ELISA	21

6.5. Extracción del RNA Total para Medición de Mediadores Inflamatorios	21
6.6. Análisis Estadístico	22
7. RESULTADOS	24
7.1 Producción de Citocinas Pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en suero de Cerdo	24
7.2 Expresión Relativa de RNAm de los Mediadores Proinflamatorios COX-2, iNOS, NF-kB, PPAR- γ y TNF- α en CMN de Cerdo	31
7.3 Carga Viral y TNF- α	42
8. CONCLUSIÓN	46
9. BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras del ácido linoleico y de sus dos isómeros principales: <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-CLA (<i>c</i> 9, <i>t</i> 11) y <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12-CLA (<i>t</i> 10, <i>c</i> 12).	5
Figura 2. Respuesta inmune frente a la infección por PRRSV.	14
Figura 3. Producción de citocinas pro-inflamatorias en suero de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%).	25
Figura 4. Producción de TNF- α en suero de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%).	29
Figura 5. Expresión relativa de RNAm de COX-2 en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, estimuladas <i>in vitro</i> con LPS y virus.	32
Figura 6. Expresión relativa de RNAm de iNOS en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, estimuladas <i>in vitro</i> con LPS y virus.	34
Figura 7. Expresión relativa de RNAm de NF-kB en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, estimuladas <i>in vitro</i> con LPS y virus.	36
Figura 8. Expresión relativa de RNAm de PPAR- γ en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, estimuladas <i>in vitro</i> con LPS y virus.	38
Figura 9. Expresión relativa de RNAm de TNF- α en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, estimuladas <i>in vitro</i> con LPS y VIRUS. A) Semana 0, B) Semana 1pi.	41

- Figura 10. Carga viral y producción de TNF- α en suero de cerdos 43
alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA
(CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%).
- Figura 11. Carga viral y expresión relativa de RNAm de TNF- α a la 44
primera semana post-infección en CMN de cerdos
alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA
(CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%) y estimuladas in vitro
con LPS y virus PRRS.

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ingredientes de las dietas (kg/ton).	19
Tabla 2. Secuencias de iniciadores y sondas.	23

RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés) es una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico que presentan varias propiedades benéficas para la salud, entre ellas su efecto antiinflamatorio. Este efecto se ha visto en diferentes modelos animales, sin embargo, se desconoce su efecto en cerdos infectados con el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en el sector productivo porcícola. El objetivo fue evaluar el efecto del CLA dietario sobre la producción y expresión de citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α y mediadores de la inflamación COX-2, iNOS, NF- κ B y PPAR- γ en cerdos infectados con PRRSV. Se determinó la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α por ELISA en suero de 15 cerdos alimentados con dietas con 0%, 1% y 2% de CLA durante seis semanas e infectados con PRRSV, así como la expresión relativa de RNAm de COX-2, iNOS, NF- κ B, PPAR- γ y TNF- α por qRT-PCR en células mononucleares de cerdos con los mismos tratamientos. En cerdos infectados con PRRSV, ambas concentraciones de CLA dietario incrementaron ($p < 0.05$) la producción de TNF- α en suero, mientras que la dieta al 1% CLA disminuyó ($p < 0.05$) la producción de IL-6 y la dieta al 2% CLA disminuyó la producción de IL-1 β . La expresión de RNAm de NF- κ B aumentó por efecto del CLA (1%CLA) en cerdos infectados y disminuyó la expresión de PPAR- γ (2%CLA), mientras que para la expresión de RNAm de COX-2, iNOS y TNF- α el CLA no tuvo efectos. Por lo anterior, se puede concluir que el CLA no tuvo efectos en los mediadores de inflamación COX-2, iNOS y TNF- α ; sin embargo, la expresión de RNAm de NF- κ B aumentó en CMN, en cambio la expresión de RNAm de PPAR- γ se encontró disminuida en cerdos infectados con PRRSV alimentados con CLA. El patrón de respuesta al CLA difiere al reportado en trabajos previos; sin embargo, es importante enfatizar que éste, es el primero que involucra la suplementación con CLA, en cerdos infectados con PRRSV, lo que sugiere que el virus pudiera ser el responsable de la discrepancia en la respuesta encontrada.

1. INTRODUCCIÓN

En la industria porcina es muy importante producir animales sanos, con una buena respuesta inmune ante las infecciones. De esta manera, los costos por medicamentos son menores y aumenta la eficiencia en la ganancia de peso. Para lograr esto, se utilizan promotores de crecimiento y antibióticos para combatir las enfermedades; sin embargo, el uso de estos últimos se restringe cada vez más debido a que han creado resistencia.

Es importante buscar alternativas al uso de antibióticos a través de la nutrición que puedan fortalecer el sistema inmunológico de los cerdos sin inducir resistencia. Una de ellas podría ser el ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés). Éste comprende a un grupo de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, presente de forma natural en tejidos animales. Sus características bioquímicas le confieren la capacidad de incorporarse a membranas celulares y bloquear algunos de los procesos metabólicos implicados en el desarrollo del cáncer, estrés inmunológico y se ha reportado su capacidad de potenciar la respuesta inmune (Bassaganya-Riera y cols., 2001).

Una de las enfermedades de mayor impacto económico que afecta al sector productivo porcícola es el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) causado por el virus del mismo nombre (PRRSV). Éste causa trastornos severos en la capacidad reproductiva y en el sistema respiratorio de los cerdos, y afecta el crecimiento de los lechones. Dichos daños provocan el aumento del uso de medicamentos y hacen que disminuya el aprovechamiento del alimento, incrementando los costos de producción.

Varias investigaciones han mostrado la importancia del CLA en cerdos, ya que incide sobre el crecimiento mejorando la conversión del alimento y reduciendo

el contenido de grasa de la canal (Dugan y cols., 2004). Además, el CLA ha mostrado efectos positivos en la proliferación de linfocitos, producción de inmunoglobulinas, de citocinas proinflamatorias y algunos mediadores de la inflamación en varias especies y líneas celulares (Changua y cols., 2005a; Bassaganya-Riera y cols., 2001 y 2003; Corino y cols., 2002, Yamasaki y cols., 2003). Sin embargo, los reportes en cerdos respecto a citocinas proinflamatorias aún son escasos y no se ha evaluado la función del CLA dietario sobre los mediadores de inflamación en cerdos infectados con PRRSV. Por tal motivo, es necesario generar información sobre los efectos del CLA en la respuesta inmune inflamatoria de cerdos infectados con este virus, con el propósito de fortalecer la salud de estos animales reduciendo los efectos negativos causados por la infección.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

El CLA hace referencia a un grupo de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico, en el cual sus dos dobles enlaces se encuentran conjugados, es decir, separados por un enlace sencillo (Kelly, 2001). De estos isómeros los más estudiados han sido el *cis*-9, *trans*-11-CLA (ácido *cis*, *trans*-9,11-octadecadienoico) y *trans*-10, *cis*-12-CLA (ácido *trans*, *cis*-10,12-octadecadienoico) (Figura 1). Éstos, se encuentran principalmente en los productos lácteos y cárnicos derivados de rumiantes donde se forman por la actividad de ciertas bacterias que se encuentran en el rumen intestinal, principalmente por la acción de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kim y cols., 2000). El CLA también se puede producir sintéticamente aplicando altas temperaturas al ácido linoleico en presencia de un álcali fuerte, proceso en el que se produce una mezcla compleja de isómeros. El hecho de que el CLA se encuentre en forma de mezcla, pudiera ocasionar sinergismo o efectos antagónicos entre los diversos isómeros cuando se incluye en tratamiento dietario (Belury, 2002; Kelly, 2001).

2.2. Propiedades Biológicas

En varios trabajos de experimentación en diferentes especies animales y líneas celulares se ha visto que el CLA, tanto en mezcla como sus isómeros individuales, presenta diversas propiedades benéficas para la salud. Entre ellas destacan su efecto hipocolesterolémico, antiaterogénico y la reducción de peso corporal. Así mismo, estudios realizados en líneas celulares cancerosas, sugieren que el CLA protege contra ciertos tipos de cáncer. Además se ha

reportado que tiene función antioxidante y mejora algunos parámetros de la respuesta inmune (Belury, 2002; Chen y cols., 2003; Lee y cols., 2006; Ryder y cols., 2001; West y cols., 2000).

2.3. Acción Inmunomoduladora del CLA: Producción de citocinas

Una de las propiedades de mayor interés para la salud que presenta el CLA, es su efecto en la respuesta inmunológica. Algunos estudios han mostrado su participación en la respuesta inmune a nivel de proliferación de linfocitos y producción de citocinas pro-inflamatorias. Estas observaciones se han realizado tanto *in vitro*, como *in vivo* y *ex vivo*, en diferentes modelos animales, entre ellos el cerdo, aunque los estudios publicados en esta especie aún son escasos (Bassaganya y cols., 2003; Hayek y cols., 1999; Yamasaki y cols., 2003). La mayoría de las investigaciones han utilizado mezclas de isómeros, observando resultados contradictorios en cuanto a la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, así como de citocinas. Estos reportes indican que el efecto del CLA puede variar dependiendo del tipo de célula, así como de la presencia de otros compuestos que puedan actuar sinérgica o antagónicamente, por lo que es necesario realizar más investigación al respecto (Chew y cols., 1997, Changua y cols., 2005b, Luongo y cols., 2003, Peralta-Quintana, 2008, Quintana, 2006).

En cuanto a los efectos del CLA sobre las citocinas, se ha visto que en ratas alimentadas con una dieta conteniendo CLA, hay una disminución de la producción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e IL-6 por macrófagos peritoneales (Turek y cols., 1998). Así mismo, Akahoshi y cols., (2002) reportaron resultados similares en cuanto a una disminución de los niveles de

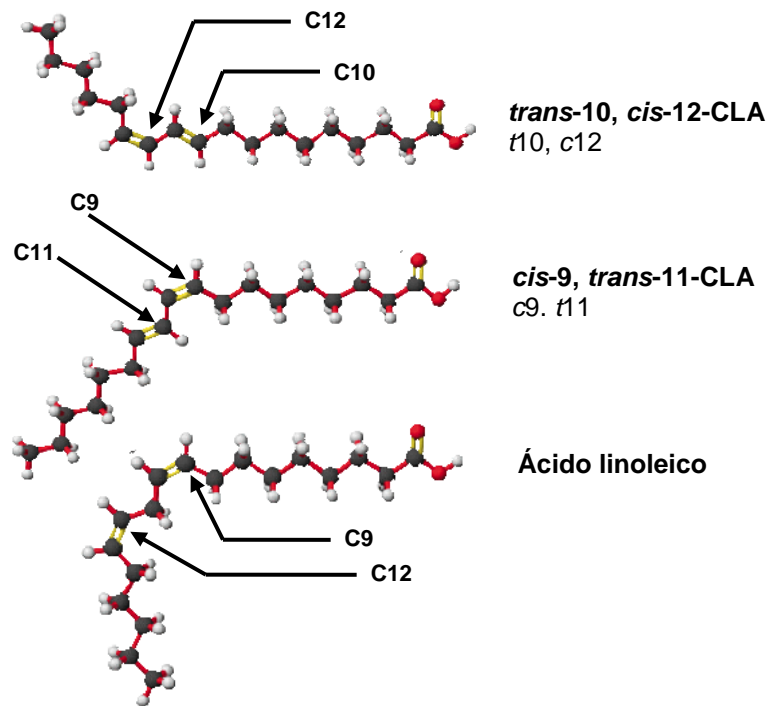


Figura 1. Estructuras del ácido linoleico y de sus dos isómeros principales: *cis*-9, *trans*-11-CLA (*c*9, *t*11) y *trans*-10, *cis*-12-CLA (*t*10, *c*12) (Steinhart, 1996).

TNF- α sérico en ratones alimentados con 1% de CLA y en cerdos infectados con PCV2 (circovirus porcino tipo II) se ha visto que suprime la producción de interferón gama (IFN- γ) específico para el virus por las células T CD4+ (Bassaganya-Riera y cols., 2003). Por otro lado, en un trabajo realizado en el 2006 por Gil-Salido sobre la producción de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en CMN de cerdos suplementadas *in vitro* con los isómeros de *cis*-9, *trans*-11-CLA, *trans*-10, *cis*-12-CLA y una mezcla 1:1 a diferentes concentraciones, no se observó ningún efecto. Así, en base a las investigaciones realizadas, los resultados sugieren que dependiendo del isómero utilizado y de su concentración, se puede obtener resultados diferentes.

Así mismo, también se ha evaluado el efecto de los isómeros individuales *cis*-9, *trans*-11-CLA y *trans*-10, *cis*-12-CLA. Ambos compuestos, principalmente el segundo, inhiben la expresión y producción *in vitro* de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en cerdos inyectados con lipopolisacárido (LPS) (Changua y cols., 2005a). En un estudio en ratones desafiados con LPS y alimentados con los isómeros por separado, el que tuvo mayor efecto sobre la reducción de los niveles de TNF- α *in vivo* fue el *cis*-9, *trans*-11-CLA (Park y cols., 2007). Estos trabajos indican que el CLA puede disminuir la producción de citocinas inflamatorias dependiendo del isómero o de la mezcla utilizada, de la especie animal, o bien, de la estimulación, ya sea por bacterias o el tipo de virus.

En un estudio reciente, se evaluó el efecto de la alimentación con CLA en cerdos sanos, sobre la respuesta inmune e inflamatoria. Se observó que los niveles de TNF- α disminuyeron; sin embargo, este efecto desapareció cuando se suspendió la suplementación con CLA sugiriendo que los efectos del CLA pueden ser dependiente del tiempo de suplementación (Malovrh y cols., 2009).

2.4. Mecanismos de Regulación del Sistema Inmune por el CLA

Se ha propuesto que el CLA podría modular el sistema inmune mediante dos mecanismos: uno dependiente de la síntesis de eicosanoides y otro dependiente de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR). De acuerdo a algunos autores, el CLA disminuye la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) en ratas y cerdos e induce un aumento de la expresión del PPAR. Estos mediadores juegan un papel importante en la respuesta inmune y en los procesos de inflamación (Moya-Camarena y cols., 1999; Belury y cols., 2002; Harris y cols., 2002; Lai y cols., 2005a).

2.4.1. Modulación Dependiente de Eicosanoides

Los eicosanoides incluyen una serie de sustancias como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que participan en el proceso inflamatorio, y cuyo precursor principal es el ácido araquidónico. Éste se forma a partir del ácido linoleico por acción de las enzimas delta 6 desaturasa y una elongasa y se incorpora en la membrana de fosfolípidos. Tras la estimulación por varios agentes tales como LPS, citocinas y hormonas, es liberado de la membrana plasmática por acción de la fosfolipasa A2 en forma de araquidonato, el cual es sustrato de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa, produciéndose PGE2 y leucotrienos (Martínez y cols., 2000). En cambio, cuando el que predomina es el CLA, se produce araquidonato conjugado el cual no es sustrato para la lipooxigenasa ni para la ciclooxigenasa y por lo tanto, no se producen PGE2 ni leucotrienos. Las PGE2 inhiben la producción de citocinas proinflamatorias así como de TNF- α y posiblemente el CLA puede disminuir la producción de estas citocinas, a través de la regulación de los eicosanoides (Pariza y cols., 2000).

En un estudio en ratones, se examinó el efecto de los dos isómeros principales del CLA individualmente sobre la expresión de RNAm de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y PGE2 *in vitro* e *in vivo*, inducida por LPS, y el mecanismo por el cual el CLA afecta estos mediadores. Se observó que el isómero activo fue el *trans*-10, *cis*-12-CLA el cual inhibió el nivel de expresión de COX-2 y de PGE2, a la concentración de 100 µM. La reducción de RNAm de COX-2 fue atribuida a una inhibición del factor nuclear kB (NF-kB) por el *trans*-10, *cis*-12-CLA (Li y cols., 2005). Resultados similares fueron encontrados en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, en los cuales el CLA redujo la expresión de RNAm y proteína de iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) y COX -2, y consecuentemente de óxido nítrico (NO) y PGE2. Esta disminución fue debida a que el CLA también inhibió la expresión de la proteína inhibitoria kBα y p65 del NF-kB en esta línea celular (Weng-Li y cols., 2004). Estos datos sugieren que la supresión de la actividad de NF-kB es uno de los mecanismos para la reducción de la expresión de algunos mediadores que participan en el proceso inflamatorio (Li y cols., 2005).

En otro trabajo, se examinó el efecto del CLA sobre la síntesis de PGE2 y óxido nítrico (NO) en macrófagos activados con endotoxina. El CLA disminuyó la producción de ambos, además de COX-2 e iNOS. Estos resultados indican que el CLA en macrófagos activados con la endotoxina disminuye la síntesis de PGE2 y NO mediante la supresión de la transcripción de COX-2 y iNOS (Iwakiri y cols., 2002). El mismo efecto se observó en cerdos alimentados con una dieta con 2% de CLA, en los cuales la producción de PGE2 y IL-1β se vio disminuida (Changua y cols., 2005b). Dichos resultados muestran que el CLA podría actuar como un modulador de la respuesta inmune a través de la regulación de los mediadores de la inflamación.

2.4.2. Modulación Dependiente del PPAR

Los PPAR son un grupo de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción regulando la expresión de varios genes. La unión del ligando al PPAR resulta en su activación como factor transcripcional. Los isómeros del CLA pueden unirse y activar al PPAR para que se una a secuencias de ADN específicas (PPRE, o elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas). Éstas se presentan en los genes bajo control (Uauy y cols., 2000) modulando de esta manera el sistema inmune (Moya-Camarena y cols., 1999).

En un estudio realizado por Hontecillas y cols., en el 2002, se indujo colitis bacteriana a cerdos alimentados con CLA observándose un incremento en la expresión de PPAR- γ en los nódulos linfáticos, un aumento de linfocitos CD8+ y una disminución de linfocitos CD4+. De la misma manera, en cerdos, el CLA dietario aumentó la producción de PPAR- γ y IL-10 en bazo y timo de estos animales tras ser estimulados con LPS (Changua y cols., 2005a). Otro estudio reporta, que los isómeros del CLA activan el PPAR- γ en macrófagos RAW264.7 de ratón disminuyendo la expresión de RNAm de mediadores de la inflamación como COX-2, iNOS y TNF- α inducida por IFN- γ y consecuentemente, la producción de PGE2 y NO. Otras citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β y IL-6 también disminuyeron por el tratamiento con CLA en células RAW (Yu y cols., 2002). Este aumento en la expresión de PPAR- γ , se relacionó con la disminución de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6 y IL-1 β), debido quizás a que antagoniza con los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 inhibiendo su producción por esta vía (Lai y cols., 2005a; Jones y cols., 2002).

2.5. PRRSV: Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

El virus de síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) es el agente causal de una enfermedad en cerdos que resulta en considerables pérdidas económicas en la industria porcina. Esto se debe al grave daño reproductivo en cerdas de cualquier paridad y a trastornos respiratorios en cerdos no destetados y en crecimiento (Benfield y cols., 1992). La enfermedad del PRRSV presenta un periodo de incubación variable oscilando entre 5 y 35 días. El virus penetra por vía oro-nasal, desde donde se difunde a pulmón para replicarse en macrófagos alveolares, eventualmente lisa las células y es liberado sistémicamente en el cuerpo (Benfield y cols., 1992). Desde el pulmón el virus se disemina vía hematogena y la viremia puede detectarse de los días 1 pos-infección (pi) hasta como máximo el día 56. Debido a la diseminación hematogena, el virus llega a los distintos órganos, destacando de modo importante el bazo, donde posiblemente, el virus continúe replicándose en los macrófagos esplénicos. El virus puede persistir en una población infectada al menos durante seis meses tras el cese de los signos clínicos, posiblemente debido a la infección de nuevos cerdos susceptibles (Osorio, 2002).

2.5.1. Agente Etiológico

El virus del PRRS ha sido descrito como un pequeño virus de RNA envuelto, con similitudes morfológicas y morfogenéticas a miembros del grupo arterivirus. El genoma del PRRSV es una molécula de RNA positivo de cadena sencilla poliadenilado, aproximadamente de 15 kb de longitud. Contiene nueve marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales son expresados como un conjunto anidado de RNAs subgenómicos (Conzelman y cols., 1993; Wu y cols., 2001). El virión contiene tres proteínas estructurales principales: una proteína de la

nucleocápside de 15 kDa (N), una proteína de membrana no glicosilada de 18-19 kDa (M), y una proteína de membrana glicosilada de aproximadamente 25 kDa (E), codificadas por los ORFs 7, 6 y 5 respectivamente (Mardassi y cols., 1996).

2.5.2. Manifestaciones Clínicas

La sintomatología de la infección por PRRSV es variable, afectando a los sistemas reproductor, respiratorio y circulatorio. Como síntomas tempranos aparecen inapetencia, letargia, depresión y fiebre moderada (39-40°C). En algunas granjas también se observan como signos iniciales de la enfermedad cianosis transitoria de orejas, vulva, cola, y abdomen, que a menudo no afectan a más del 5 % de los cerdos. Dicha cianosis en casos extremos puede producir necrosis de las extremidades (Mengeling y cols., 2000).

En cerdos en crecimiento, los signos son variables, desde enfermedad respiratoria severa hasta animales que no muestran dichos síntomas. Además, también se han señalado casos de infecciones subclínicas en granjas americanas, apareciendo individuos asintomáticos seropositivos. Entre los síntomas respiratorios es frecuente que se presente disnea y polipnea debido a que los animales desarrollan una neumonía intersticial. Ésta, por lo general, se complica con otros patógenos tales como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, así como con virus tales como herpesvirus, citomegalovirus, coronavirus porcino y paramixovirus. Por otro lado, el cuadro reproductivo se caracteriza por causar abortos en el último tercio de gestación, aumento de fetos momificados, mortinatos y mortalidad predestete (Osorio, 2002).

2.5.3. Impacto en la Producción Porcina

Los principales problemas con los que se enfrenta hoy en día el sector porcino son el empeoramiento de los índices productivos y las pérdidas económicas derivadas por enfermedades respiratorias en animales en etapas de desarrollo y engorde. Los agentes infecciosos más frecuentemente involucrados son virales y bacterianos; sin embargo, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino continúa encabezando la lista de enfermedades que causan pérdidas elevadas y significativas en la industria porcina mundial. En Estados Unidos el PRRSV da lugar a pérdidas anuales de aproximadamente 560,32 millones de dólares (Neuman y cols., 2005) y en México, aunque no se ha registrado una cifra aproximada de pérdidas, algunos estudios reportan que varían de 250 a 500 dólares por hembra (Carreón y cols., 1999).

2.6. Respuesta Inmune Frente al PRRSV

El PRRSV es capaz de modular el sistema inmune porcino a través de mecanismos que aún no han sido bien descritos o definidos. Este virus causa un retraso inusual en el desarrollo de la respuesta inmune específica en cerdos infectados. Dicho retraso en la aparición de la respuesta inmune tanto celular como humoral sugiere que la infección por el PRRSV implica un mecanismo de inmunomodulación o inmunosupresión (Murtaugh y cols., 2002; Suarez, 1995).

2.6.1. Respuesta Humoral

La respuesta inmune normal para la eliminación de virus por los fagocitos mononucleares es la formación de inmunocomplejos. En el caso del PRRSV,

éstos parecen jugar un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente. Se ha sugerido que la presencia de anticuerpos específicos para el virus, pudiera incrementar su replicación con aumentos del título vírico de 10 a 100 veces. Esto parece indicar que los anticuerpos no siempre protegen frente a la infección por PRRSV, sino que tienen un papel protector limitado (Suárez, 1995).

Los cerdos infectados por PRRSV pueden permanecer virémicos de 4 a 6 semanas después de la formación de anticuerpos. Durante este periodo son capaces de transmitir la enfermedad a otros cerdos coexistiendo virus y anticuerpos (Figura 2) (Mateu y cols., 2007).

2.6.2. Inmunidad Celular

Se ha propuesto, en base a otras infecciones virales, que el principal papel de la protección contra el PRRSV se centra en la respuesta inmune mediada por células. Los cerdos infectados desarrollan una respuesta linfoproliferativa específica para PRRSV mediada por células T que empieza a las 4 semanas pi y finaliza entre la 9ª y la 14ª semana (Osorio, 2002). Recientemente se ha reportado que el virus es capaz de inducir un incremento de células T reguladoras (T Foxp3+CD25+) *in vitro*, a través de células dendríticas infectadas, lo cual podría sugerir una forma de modulación del sistema inmune porcino por parte del virus (Silva-Campa y cols., 2009).

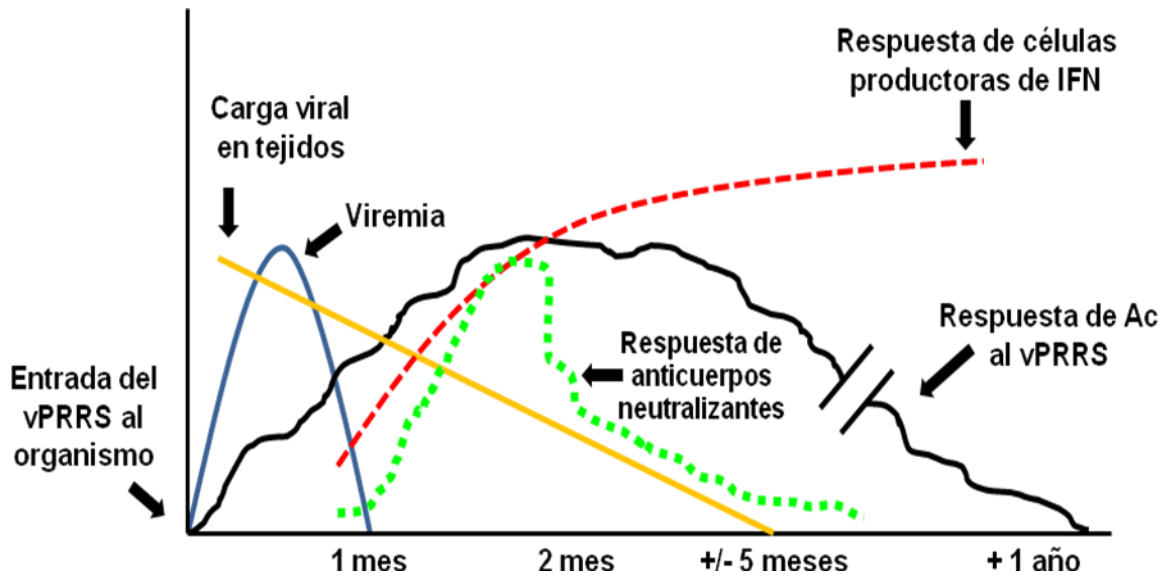


Figura 2. Respuesta inmune frente a la infección por PRRSV (Osorio, 2002).

Por otro lado, la respuesta de citocinas frente a la infección por PRRSV está dada principalmente por la producción de IFN- γ y en menor medida por la IL-2 (Mateu y cols., 2007). La respuesta por las células productoras de IFN- γ específicas de PRRSV logra niveles perceptibles después de 4 semanas pi y es cuando la producción de IL-6 se ve aumentada (Mateu y cols., 2007). Otros estudios han reportado que la infección por PRRSV o la vacunación pueden disminuir la respuesta de citocinas inflamatorias y aumentar la expresión de IL-10 (Díaz y cols., 2006; Meier y cols., 2003; Suradhat y cols., 2003). Además, se ha reportado que este virus infecta las células dendríticas inmaduras y maduras derivadas de monocitos e interfiere con algunas de sus funciones. Las células dendríticas inmaduras infectadas con el PRRSV disminuyen la producción de RNAm de IFN- α y aumentan el RNAm de IFN- β y TNF- α sin alterar la producción de IL-10, IL-12 e IFN- γ (Charemtantanakul y cols., 2006; Loving y cols., 2007; Wang y cols., 2007). En las células dendríticas maduras el PRRSV induce apoptosis y aumenta la expresión de IL-10 anti-inflamatoria (RNAm y proteína) indicando que la modulación de células dendríticas maduras podría mejorar la activación de células T frente a la infección con PRRSV (Flores-Mendoza y cols., 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas hasta la fecha en cuanto a CLA y producción de citocinas proinflamatorias y mediadores de la inflamación, han mostrado resultados prometedores en el mejoramiento de la respuesta inflamatoria. El CLA disminuye la producción de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , así como de COX-2 e iNOS en varios modelos animales (ratas, ratones y escasamente cerdos) y líneas celulares (macrófagos de ratón). Sin embargo, a la fecha no se han realizados estudios respecto a estas citocinas y mediadores de la inflamación en cerdos alimentados con CLA e infectados con el virus PRRSV, y dada la naturaleza e importancia de este virus, es importante conocer cómo afecta el CLA en la producción de estos mediadores, para determinar el posible beneficio en la infección con PRRSV.

4. HIPÓTESIS

El CLA dietario modula la respuesta inflamatoria de cerdos infectados con el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto del CLA dietario sobre la producción de citocinas inflamatorias y mediadores de la inflamación en cerdos infectados con el virus del PRRS.

5.2. Objetivos Particulares

- Determinar el efecto del CLA dietario sobre la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α por ELISA en suero de cerdos infectados con PRRSV.
- Analizar el efecto del CLA dietario sobre la expresión relativa de COX-2, iNOS, NF- κ B, PPAR- γ y TNF- α por qRT-PCR en CMN de cerdos infectados con PRRSV.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño Experimental

Para el experimento, se utilizaron 15 cerdos sanos de 21 ± 3 días de edad divididos en 3 grupos de 6 cerdos cada uno, alojados en la unidad metabólica animal de CIAD A.C. durante un periodo de 6 semanas. Los animales se mantuvieron en un ambiente a una temperatura constante de 25°C y libre de vectores mecánicos (moscas y mosquitos). Las dietas fueron isoenergéticas e isoprotéicas, formuladas siguiendo las recomendaciones de la National Research Council (NRC, 1998). El CLA (CLA-Lutalin™ BASF) adicionado a la dieta contenía 30% del isómero *cis*- 9, *trans*-11-CLA y 30% del isómero *trans*-10, *cis*-12-CLA) y se ajustó a los niveles de aceite incluidos en ella (Tabla 1).

Los tratamientos por grupo fueron los siguientes:

- a) Dieta SCLA (Sin CLA) + infección
- b) Dieta CLA 1% + infección
- c) Dieta CLA 2% + infección

Los animales tuvieron cuatro días de adaptación y a partir del día cinco se inició la suplementación con CLA por dos semanas. Después fueron infectados con una cepa de referencia norteamericana de PRRSV (NVSL-97-7895) vía intranasal (2×10^5 DICT₅₀/ml) y vía intramuscular (3×10^5 DICT₅₀/ml), continuando con las dietas experimentales durante cuatro semanas más. Los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*. Se tomaron muestras de sangre y suero cada semana desde el inicio hasta el final del periodo de experimentación para la evaluación de las citocinas y mediadores de inflamación.

Tabla 1. Ingredientes de las dietas (kg/ton)

INGREDIENTES	Sin CLA	1%CLA	2% CLA
Maíz ADM	647.000	647.000	647.000
Pasta de Soya	260.000	260.000	260.000
Salvado de Trigo	34.000	34.000	34.000
Aceite			
- Soya	20.000	10.000	-----
- CLA	-----	10.000	20.000
Calcio	12.000	12.000	12.000
Fosfato 21/18	9.000	9.000	9.000
Sal	4.000	4.000	4.000
Lisina	4.000	4.000	4.000
Bact-acid	2.000	2.000	2.000
Metionina 99%	1.000	1.000	1.000
L-Treonina	1.000	1.000	1.000
Minerales	1.000	1.000	1.000
Vitaminas	1.000	1.000	1.000
Oxido de Zinc	0.700	0.700	0.700
Colina 60%	0.720	0.720	0.720
Sulfato de Cobre	0.250	0.250	0.250
Ronozyme	0.200	0.200	0.200
L-Triptofano	0.200	0.200	0.200
Sucram	0.150	0.150	0.150
Oxidox Plus	0.150	0.150	0.150

Así mismo, una vez infectados los animales, se determinó la carga viral (partículas virales/ml de sangre) a la primera y cuarta semana post-infección por qRT-PCR, utilizando un kit comercial de diagnóstico para enfermedades de ganado porcino específico para PRRSV (VetAlert™, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus US PRRSV Specific Reagent, Tetracore R, Inc), siguiendo las especificaciones del proveedor.

6.2. Extracción de Células Mononucleares (CMN)

Se extrajo sangre periférica de los cerdos en tubos con heparina, para obtener las CMN a partir de gradientes de densidad con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). La sangre se diluyó 1:1 con buffer de fosfato (PBS, pH 7.4) estéril y se agregó ficoll en un tubo estéril en una proporción 1:3 respecto a la sangre diluida. Los tubos se centrifugaron a 1600 rpm por 30 minutos a 4° C y posteriormente se separó la capa de CMN con una pipeta Pasteur estéril.

Una vez separadas las células, se lavaron con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mM de piruvato de sodio (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 2×10^{-5} mM 2-mercaptoetanol (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) inactivado por calor. Para esto, se centrifugó a 1400 rpm por 5 minutos, después se les agregó 5 ml de NH₄Cl y se incubó por 5 minutos para de nuevo lavarse tres veces con medio RPMI-1640 con SFB. La viabilidad de las células se determinó utilizando la cámara de Neubauer con azul de tripano (Sigma) como colorante de exclusión.

6.3. Cultivo Celular

Las CMN (1×10^6) se cultivaron en placas estériles de 48 pozos (Corning Incorporated Costar) manteniendo un volumen final de 600 μ L con medio RPMI-1640 suplementado con antibióticos y 10% de SFB. Estas fueron estimuladas *in vitro* con la cepa de PRRSV NVSL-97-7895 (Gen Bank accession No. AY545985) a un m.o.i. (multiplicidad de la infección) de 0.1 y con LPS (10 μ g/mL). Las CMN fueron incubadas por 24h a 37°C en un ambiente con 5 % de CO₂ y 80% de humedad. Transcurridas las primeras 21 h, se agregó el LPS y se incubó por 3h, para posteriormente colectar las células de los diferentes tratamientos para evaluar los mediadores proinflamatorios por qRT-PCR.

6.4. Detección de las Citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α por ELISA

Se tomaron muestras de suero de los cerdos en cada una de las semanas muestreadas y se almacenaron a -80°C para posteriormente cuantificar los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α utilizando una serie de juegos de reactivos comerciales de ELISA para cerdos (BioSource Immunoassay Kit), siguiendo las indicaciones del proveedor.

6.5. Extracción del RNA Total para Medición de Mediadores Inflamatorios

La expresión del RNAm de iNOS, COX-2, PPAR- γ , NF- κ B y TNF- α , fue cuantificada por qRT-PCR. La carga viral de los cerdos infectados también fue cuantificada por PCR en tiempo real según lo descrito por Christopher-Hennings et al., (2006). El RNA total fue extraído de las CMN de cerdos sanos e infectados, estimuladas *in vitro* con PRRSV y LPS, cultivadas durante 24h

usando RNAeasy Protocol Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó qRT-PCR utilizando *one-step* QRT-PCR Core Reagent Kits Brilliant* Master Mix (Stratagene) y el sistema SmartCycler.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 50°C por 30 min y 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 seg y a 60°C por 1 min. Los iniciadores y sondas se presentan en la Tabla 2.

Los valores de la Ct (primer ciclo de la PCR donde se detecta producto amplificado) de los diferentes tratamientos fueron normalizados contra un gen control endógeno (Ribosomal Protein L32, RPL32) y las diferencias en los valores de las Ct de los diferentes tratamientos fueron evaluados usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados fueron expresados como incrementos relativos de RNAm entre los tratamientos y los controles.

6.6. Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar donde los resultados se analizaron por un análisis de varianza ANOVA para determinar los efectos de los tratamientos. Para determinar la correlación entre NF-κB y TNF-α se utilizó la prueba de Pearson. Las diferencias entre las medias fueron evaluadas a través de la prueba de Tukey con un 95% de confianza utilizando el paquete estadístico NCSS-97.

Tabla 2. Secuencias de iniciadores y sondas.

Gen	Secuencia Iniciador Forward (5' a 3')	Secuencia Iniciador Reverse (5' a 3')	Secuencia Sonda (5' a 3')
TNF-α^a	CAGTGGCCCGAAGTGGACT	TTGTCTGAAATGACGATGATTGG	TET-CCTGAGGATGTTGCAAAGGACGAATATGTGT-BHQ1
COX-2^a	CTGAACACCTCCGCTTTGC	AAGCACATCGCACACTCTATTATGT	TET-CAGACCAGGCACCAGACCAAAGACCTC-BHQ1
iNOS^a	CGTTATGCCACCAACAATGG	AGACCCGGAAGTCGTGCTT	TET-ATCAGGTCGGCCATCACCGTG-BHQ1
PPAR-γ^a	GCTGTACAACAAACCTCACGAAGA	GGAAGAAACCCTTGCATCCT	TET-CCTTCCAACCTCCCTCATGGCAATTGA-BHQ1
NF-κB1^a	CTGGCAGCTCTCCTCAAAGC	CACGAGTCATCCAGGTCATACAG	TET-CTCAAAGTTCTCCACCAGGGGATCTGCTC-BHQ1
RPL32^a	TGGAAGAGACGTTGTGAGCAA	CGGAAGTTTCTGGTACACAATGTAA	TET-ATTTGTTGCACATTAGCAGCACTTCAAGCTC-BHQ1

^aSecuencias de la base de datos Porcine Immunology and Nutrition (<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6065>).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Producción de Citocinas Pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en Suero de Cerdo.

Las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α producidas en suero de cerdos alimentados con dietas con 1% de CLA (CLA 1%), con 2% de CLA (CLA 2%) y sin CLA (SCLA), infectados y sin infectar con PRRSV se determinaron por ELISA. Las mediciones se realizaron a la semana 0 (Sem 0), la cual corresponde a la segunda semana a partir del inicio de los tratamientos experimentales y previa a la infección con el virus del PRRS y a la primera semana post-infección (Sem 1pi), que corresponde a la primera semana después de que los cerdos fueron infectados. En el caso del TNF- α también se midió su producción a la cuarta semana post-infección (Sem 4pi).

La Figura 3 presenta las medias en la producción de IL-1 β e IL6 en suero en los grupos suplementados con y sin CLA durante la semana 0 y la primera semana post-infección. En la Figura 3A se muestra que la producción de IL-1 β se vio afectada por la suplementación dietaria con CLA. Antes de que los cerdos fueran infectados con PRRSV (Sem 0) la producción de IL-1 β tendió a disminuir ($P=0.058$) en el grupo alimentado con 2% de CLA en comparación con el control (SCLA), mientras que, a la primera semana post-infección los niveles de esta citocina no se vieron afectados significativamente entre tratamientos. Sin embargo, independientemente de las semanas, la dieta con 2% de CLA disminuyó significativamente la producción respecto del grupo SCLA.

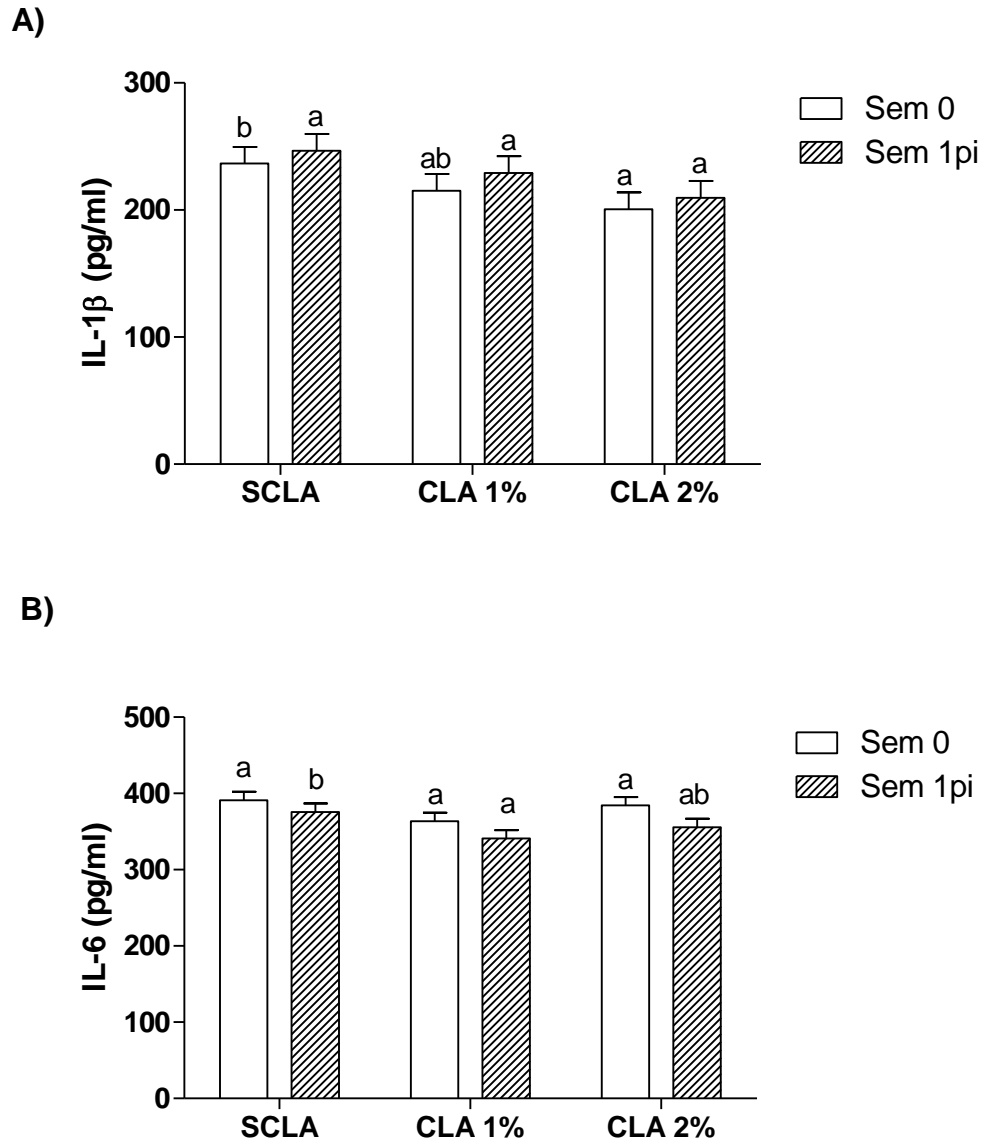


Figura 3. Producción de citocinas pro-inflamatorias en suero de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%). **A)** IL-1 β , **B)** IL-6. Sem 0: semana 0, Sem 1pi: semana 1post-infección. Literales diferentes entre tratamientos de la misma semana indican diferencias significativas ($P < 0.05$), $n = 15$ cerdos (5 por tratamiento). Las diferencias entre las medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

IL-1 β es una citocina inflamatoria producida primariamente por macrófagos activados y monocitos, y está relacionada con la infiltración de CMN en el pulmón y con los síntomas mas comunmente observados tras la infección por PRRSV, tales como fiebre y anorexia (Díaz y cols., 2006). Algunos trabajos en cerdos infectados experimentalmente con PRRSV han reportado que IL-1 β se expresa a altos niveles en macrófagos (Zhou y cols., 1992) o tejido pulmonar de cerdo a la primera y tercera semana después de la infección, respectivamente (Chiou y cols. 2000). Sin embargo, nuestros resultados en los cerdos infectados con PRRSV que no recibieron CLA no mostraron cambios significativos en la producción de IL-1 β en suero a la primera semana post-infección respecto de los cerdos sanos.

Por otro lado, se ha reportado que una dieta con 2% de CLA, disminuye la producción de IL-1 β en plasma de cerdos (Changua y cols., 2005b). Además, estudios con los isómeros individuales en cerdos inyectados con LPS han mostrado que ambos, y particularmente el trans-10, cis-12 CLA inhiben la producción y expresión *in vitro* de IL-1 β en CMN (Changua y cols., 2005a). De acuerdo con lo reportado, en nuestro trabajo se observó una disminución de IL-1 β por efecto del CLA en los cerdos sanos en comparación con los que no recibieron CLA. Sin embargo, una vez infectados con PRRSV, el CLA no modificó la producción de IL-1 β , y posiblemente, requiera de un mayor tiempo de suplementación para lograr ver un cambio significativo en los cerdos infectados.

En lo que respecta a IL-6 (Figura 3B) se puede observar que a la semana 0 no hubo cambios significativos para ninguno de los tratamientos; sin embargo, una vez infectados (Sem 1pi) su producción disminuyó significativamente en los cerdos suplementados con 1% de CLA respecto de los cerdos alimentados con dietas sin CLA. Además, la producción de IL-6 fue más baja ($P < 0.05$) a la

primera semana post-infección que antes de ser infectados con PRRSV, independientemente de la dieta.

IL-6 es una citocina que posee actividad anti-inflamatoria y proinflamatoria. Es un pirógeno endógeno y está involucrada en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas y activación de células T y es la responsable, junto con IL-1, de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado. En un estudio en cerdos infectados con PRRSV realizado por Assai y cols., en 1999, se observó un incremento en la producción de IL-6 en el suero de los animales a los 7, 14 y 21 días post-infección. Así mismo, se ha reportado que en cerdos infectados *in utero* con PRRSV, los niveles de IL-6 en CMN fueron significativamente elevados al nacimiento y a los 14 días de edad (Feng y cols., 2003).

A diferencia de los estudios anteriores, nuestros resultados en cerdos infectados con PRRSV sin suplementación con CLA no mostraron cambios significativos en la producción de IL-6 a la primera semana post-infección. Igualmente, en los grupos de cerdos sanos que recibieron las dietas con CLA no se vieron cambios en la producción de esta citocina respecto de los no suplementados. Sin embargo, se ha reportado que la suplementación con 2% CLA por 14 días, así como, con los isómeros individuales *in vitro* en cerdos de 28 días de edad desafiados con LPS, inhibieron la expresión y producción de IL-6 (Changua y cols., 2005a). Además, en macrófagos peritoneales de ratas alimentadas con 1% de CLA por 42 días, el CLA disminuyó la producción de IL-6 (Turek y cols., 1998). De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados, mostraron que la dieta al 1% CLA disminuyó la producción de IL-6 en cerdos infectados corroborando los estudios previos sobre esta citocina pero esta vez en cerdos con PRRSV.

En la Figura 4 se muestra la producción de TNF- α en suero de cerdos alimentados con dietas con y sin CLA, en la semana 0, 1 post-infección y 4 post-infección. La suplementación con CLA tuvo un efecto significativo en la producción de TNF- α en todas las semanas ($P < 0.05$). En la semana 0, antes de que los cerdos fueran infectados con PRRSV, el grupo de cerdos alimentados con 1% de CLA produjeron más TNF- α ($P < 0.05$) en comparación con los que no recibieron CLA. Este incremento significativo en el TNF- α por efecto del CLA mostrado en la semana previa a la infección también se observó a la primera semana post-infección, pero ahora en ambas concentraciones de CLA (1 y 2%). Sin embargo, hacia la cuarta semana post-infección solo la dieta al 2% CLA incrementó significativamente la producción respecto de los cerdos alimentados con dietas SCLA.

De igual manera, el grupo alimentado con 1% de CLA mostró un incremento significativo de esta citocina hacia la primera semana post-infección, mientras que en el grupo de 2% de CLA, aumentó a la primera y cuarta semana post-infección respecto de la semana 0 (Figura 4).

El TNF- α es una citocina temprana-inmediata con capacidad antiviral, secretada por macrófagos activados, células dendríticas y células T en respuesta a varias infecciones virales. Induce apoptosis en células infectadas por virus y promueve la inflamación en el sitio de la infección induciendo la producción de otras citocinas proinflamatorias. Junto con IL-1 causa infiltración y activación de leucocitos en pulmón, incremento de la permeabilidad microvascular y broncoconstricción y estimula la síntesis de IL-6 en macrófagos así como de la misma IL-1. Su producción es muy importante en el inicio de las infecciones bacterianas, así como por virus, ya que contribuye a la eliminación de estos.

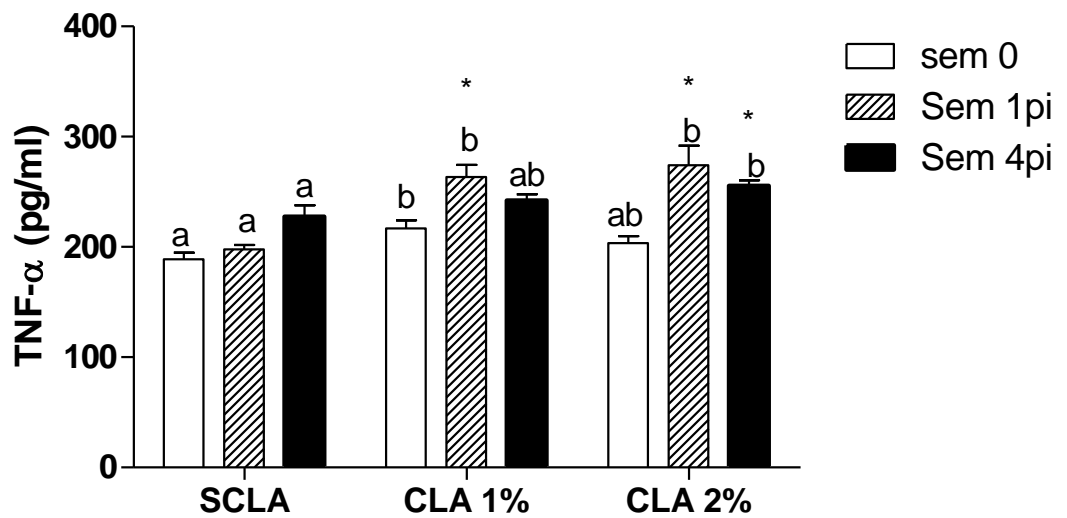


Figura 4. Producción de TNF- α en suero de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%). Sem 0: semana 0, Sem 1pi: semana 1 post-infección, Sem 4pi: semana 4 post-infección. Literales diferentes entre tratamientos de la misma semana indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $n = 15$ cerdos (5 por tratamiento). * indica las semanas que fueron diferentes de la semana cero dentro del mismo tratamiento. Las diferencias entre medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

Varios trabajos han reportado que la producción de TNF- α en respuesta a la infección por PRRSV es prácticamente inexistente (Van Reeth y cols., 1999; Chiou y cols., 2000; López-Fuertes y cols., 2000, Thanawongnuwech y cols., 2001). En cerdos infectados con este virus, se induce una mínima producción de TNF- α a los 10 días post-infección en BAL (lavado broncoalveolar) (Van Reeth y cols., 1999), así como en macrófagos alveolares; sin embargo, en estos últimos, los niveles incrementaron significativamente hacia el día 28 post-infección (Tanawongnuwech 2004). De igual manera, en otro estudio en cerdos vacunados con una cepa europea de virus vivo modificado de PRRSV se obtuvieron niveles elevados de TNF- α a los 22 y 40 días post-infección (Sipos y cols., 2003). Por el contrario, en nuestro trabajo, la producción de TNF- α no se vio modificada significativamente en los cerdos infectados con PRRSV que no recibieron CLA, no obstante, en los cerdos infectados y suplementados, la producción de TNF- α incrementó a la primera semana post-infección.

En un estudio realizado con linfocitos aislados de ratones alimentados con c9,t11-CLA la producción de TNF- α fue mayor que la de los alimentados con t10,c12-CLA y del grupo control (Yamasaki y cols., 2003). Por el contrario, Yang y Cook obtuvieron una inhibición del TNF- α en ratones alimentados con c9,t11-CLA (Yang y Cook 2003). De igual manera en ratones suplementados con una dieta al 1% de CLA disminuyeron los niveles de TNF- α en suero (Akahoshi y cols., 2002), así como en humanos alimentados con CLA por 12 semanas (Song y cols., 2005). En otro estudio realizado en cerdos sanos alimentados con CLA dietario, se redujeron los niveles de TNF- α , pero una vez suspendida la suplementación desapareció este efecto, (Malovrh y cols., 2009). Por el contrario, en nuestro trabajo, en cerdos sanos suplementados con CLA incrementó la producción de TNF- α y según nuestros resultados, esto parecería indicar que la mejora en la producción de TNF- α en cerdos infectados es debida

al CLA dietario. Sin embargo, las discrepancias en los efectos del CLA pudieran deberse al tiempo de suplementación, tipo de estímulo y el tiempo de medición.

7.2. Expresión Relativa de RNAm los Mediadores Proinflamatorios COX-2, iNOS, NF- κ B, PPAR- γ y TNF- α en CMN de Cerdo.

La expresión relativa de los mediadores proinflamatorios COX-2, iNOS, NF- κ B, PPAR- γ y TNF- α , se determinó por qRT-PCR en CMN de 12 cerdos divididos en 3 grupos de 4 animales, alimentados con dietas con 1% de CLA (CLA 1%), con 2% de CLA (CLA 2%) y sin CLA (SCLA), infectados y sin infectar con PRRSV, y estimulados *in vitro* con LPS y el mismo virus. Las mediciones se realizaron en CMN extraídas de los cerdos de cada uno de los tratamientos a la semana 0 (Sem 0), la cual corresponde a la segunda semana a partir del inicio de la suplementación dietaria y previa a la infección con el virus del PRRS, y a la primera semana post-infección (Sem 1pi), que corresponde a la primera semana después de que los cerdos fueron infectados.

La Figura 5 presenta el efecto de las dietas sobre la expresión relativa de COX-2 en CMN de cerdos estimuladas *in vitro* con LPS y virus en cada una de las semanas. En la semana 0 (Figura 5A), la expresión de COX-2 no se vio alterada significativamente por ninguna de las dietas en las células reestimuladas con LPS, sin embargo, en las estimuladas con el virus, la dieta con CLA 2% disminuyó ($P= 0.014$) significativamente su expresión respecto de la dieta con CLA 1%. Una vez infectados (a la semana 1pi), no se observaron efectos de ninguna de las dietas ni de la estimulación, así como, tampoco se encontraron diferencias en la expresión de COX-2 para ninguno de los grupos entre semanas (Figura 5B).

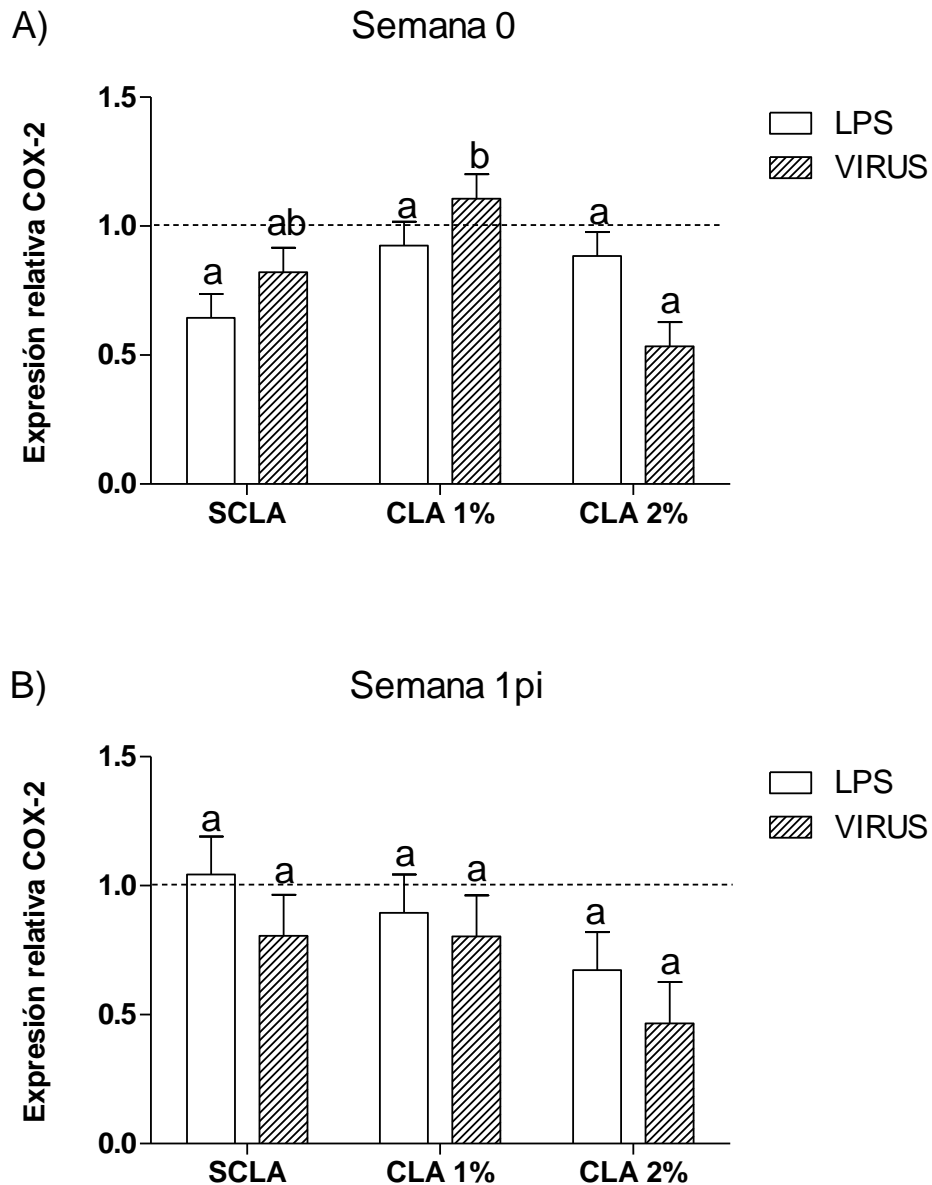


Figura 5. Expresión relativa RNAm de COX-2 en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, estimuladas *in vitro* con LPS y VIRUS. **A)** Semana 0, **B)** Semana 1pi. La línea punteada muestra el valor de células sin estimular. Literales diferentes entre el mismo estímulo indican diferencias significativas ($P < 0.05$), $n = 12$ cerdos (4 por tratamiento). Las diferencias entre las medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

COX-2 es la enzima limitante de la velocidad en la conversión de ácido araquidónico a tromboxanos y prostaglandinas. Es una isoforma altamente inducible cuya expresión es regulada por muchos factores de crecimiento, LPS y citocinas como IL-1, IL-2 y TNF- α . En un estudio realizado en ratones alimentados con los isómeros individuales de CLA, los que recibieron la dieta con t10,c12-CLA, disminuyeron la producción de la proteína COX-2 *in vivo*, así como también redujo el RNAm de COX-2 a 100 μ M *in vitro* (Li y cols., 2005). De igual manera, en macrófagos activados con endotoxina el CLA disminuyó la síntesis de PGE2 y NO a través de la inhibición de la transcripción de COX-2 (Iwakiri y cols., 2002; Weng-Ling y cols., 2004). Por otro lado, una infección viral también estimula la expresión de mediadores proinflamatorios, incluyendo COX-2, iNOS, así como citocinas proinflamatorias; sin embargo, en una infección con PRRSV, esta respuesta inflamatoria se encuentra disminuida. De acuerdo con los reportes previos, nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión de COX-2 en los cerdos sanos reestimulados con virus con la dieta al 2% CLA, pero en los cerdos infectados no hubo ningún efecto, lo que sugiere que el PRRSV atenúa el efecto del CLA sobre la expresión de este mediador.

En cuanto a iNOS, en la Figura 6 se muestra que a la semana 0, ninguna de las dietas afectó significativamente su expresión tras ser estimuladas con LPS y virus (Figura 6A), sin embargo, a la primera semana post-infección, ambas dietas con CLA redujeron la expresión de iNOS estadísticamente ($P=0.036$) en las células estimuladas con LPS, mientras que en el estímulo con virus no se observaron cambios significativos. Además, la expresión de iNOS disminuyó ($P=0.003$) en la semana 1pi por efecto de la estimulación viral a diferencia de su semana 0 (datos no mostrados) mostrando un efecto inhibitorio sobre iNOS por parte del PRRSV; sin embargo, el CLA puede contribuir en este efecto.

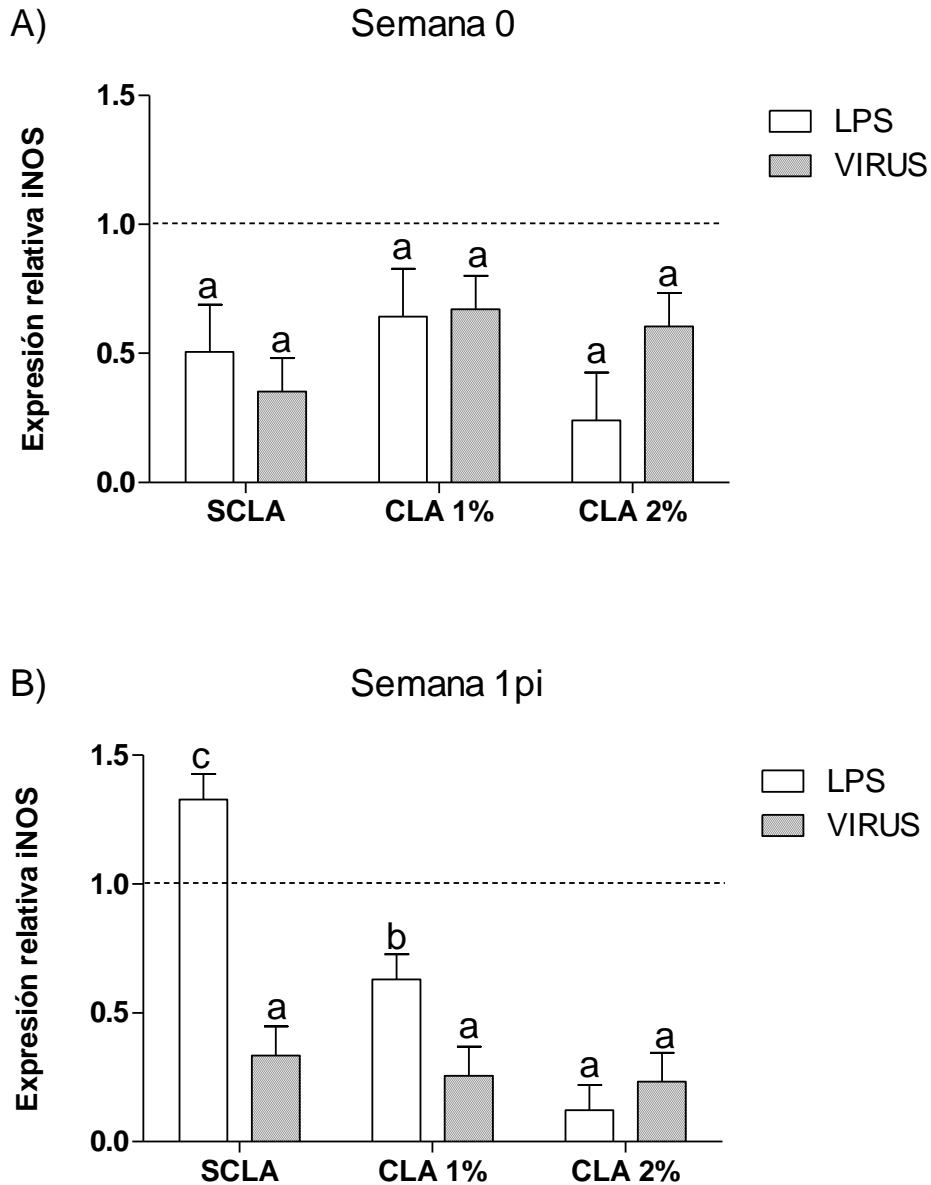


Figura 6. Expresión relativa de RNAm de iNOS en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, reestimuladas *in vitro* con LPS y VIRUS. **A)** Semana 0, **B)** Semana 1pi. La línea punteada muestra el valor de células sin estimular. Literales diferentes entre el mismo reestímulo indican diferencias significativas ($P < 0.05$), $n = 12$ cerdos (4 por tratamiento). Las diferencias entre las medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

Los reportes indican que el CLA disminuye la síntesis de NO mediante la inhibición de la transcripción de iNOS en macrófagos activados (Iwakiri y cols., 2002). Así mismo, en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, el CLA redujo la expresión de RNAm y proteína de iNOS (Weng-Ling y cols., 2004) indicando que el CLA puede reducir la expresión de algunos mediadores inflamatorios. De acuerdo con estos reportes, en nuestro trabajo, la suplementación con CLA no modificó significativamente la expresión de iNOS en cerdos a la semana 0, pero una vez infectados, los niveles de RNAm de iNOS disminuyeron en los cerdos alimentados con CLA, tras la estimulación con LPS, debido al PRRSV.

En la Figura 7 se muestra el efecto de las dietas por semanas en CMN estimuladas con LPS y virus, sobre la expresión de NF- κ B. La suplementación con CLA no afectó la expresión relativa de NF- κ B en los cerdos sanos (semana 0) para ninguno de los estímulos *in vitro*, sin embargo, a la primera semana post-infección, la dieta con CLA1% incrementó significativamente ($P=0.048754$) su expresión respecto del SCLA y del CLA 2% tras la estimulación con el virus, mientras que no para el LPS.

NF- κ B es uno de los reguladores mas importantes de la expresión de genes proinflamatorios. La síntesis de varias citocinas como el TNF- α , IL-1 β y IL-6 está mediada por este factor de transcripción, así como la expresión de COX-2 e iNOS. La suplementación dietaria con CLA ha demostrado disminuir la proteína COX-2 a través de la inhibición de la activación de NF- κ B. Un estudio realizado con los isómeros individuales *in vitro* e *in vivo* en ratones, mostró que el *t10-c12*-CLA inhibió la activación de NF- κ B y de la producción de COX-2 (Li y cols., en el 2002). Este efecto también se ha reportado en estudios realizados en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y suplementados *in vitro* con CLA, donde este inhibió la expresión de la proteína inhibitoria I κ B α y p65 del NF

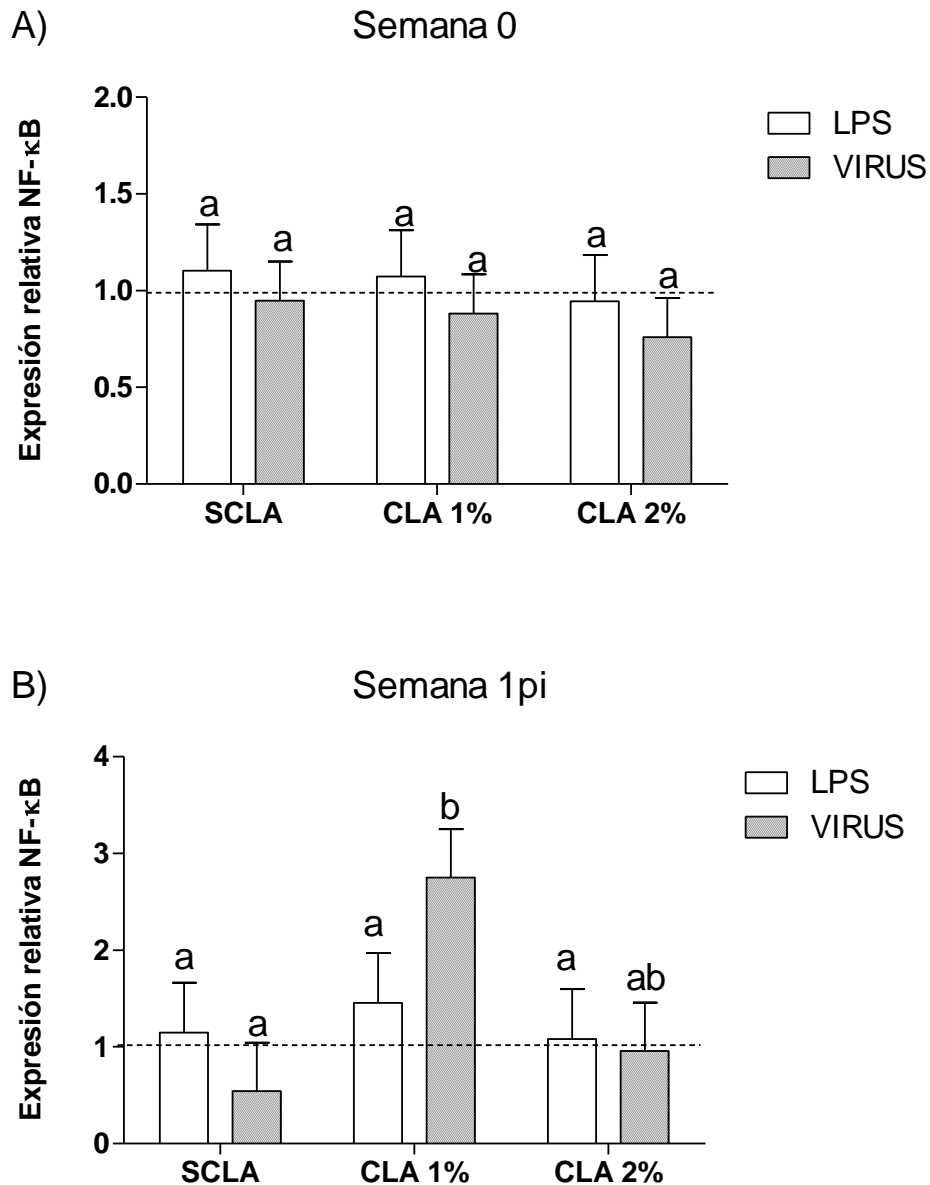


Figura 7. Expresión relativa de RNAm de NF- κ B en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, reestimuladas *in vitro* con LPS y VIRUS. **A)** Semana 0, **B)** Semana 1pi. La línea punteada muestra el valor de células sin estimular. Literales diferentes entre el mismo reestímulo indican diferencias significativas ($P < 0.05$), $n = 12$ cerdos (4 por tratamiento). Las diferencias entre las medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

-κB (Weng-Ling y cols., 2004) sugiriendo que la supresión de la actividad de NF-κB es uno de los mecanismos que disminuyen la expresión de algunos mediadores de la inflamación.

A diferencia de lo reportado, en nuestro trabajo en cerdos sanos con CLA no se vieron cambios en la expresión de NF-κB. Por otro lado en los cerdos infectados sin CLA tampoco se observaron cambios en este mediador. Se ha reportado que en células de cerdos infectadas con PRRSV, la proteína no estructural Nsp1 suprime fuertemente la actividad promotora de TNF-α inhibiendo la activación de NF-κB, mostrando esto como uno de los mecanismos de evasión inmune innata por el PRRSV durante la infección (Subramaniam y cols., 2010). Sin embargo, nuestros datos mostraron que en los cerdos infectados y suplementados hubo un incremento de su expresión con la dieta al 1% CLA, lo cual concuerda con el incremento de la producción de TNF-α en suero obtenido en este trabajo en cerdos infectados con PRRSV y suplementados con la misma dieta. Además, se encontró correlación entre la expresión de NF-κB y la producción de TNF-α de los grupos con 1 y 2% CLA reestimulados *in vitro* con virus a la semana 1 post-infección (P=0.009, P=0.031 respectivamente). Este efecto del CLA observado en la infección con PRRSV podría ser benéfico, ya que al producirse TNF-α, una citocina antiviral, ayudaría en la eliminación del virus.

En lo que respecta a la expresión de PPAR-γ, (Figura 8) antes de que los cerdos fueran infectados con PRRSV *in vivo*, ambas dietas con CLA incrementaron la expresión en las células reestimuladas con LPS, mientras que en las estimuladas con virus no se observaron efectos. Una vez infectados, en el grupo con la dieta al 2% CLA disminuyó (P<0.003) la expresión de PPAR-γ (Figura 8B) tras la estimulación con virus, respecto de los grupos con 1% CLA y SCLA, mientras que los tratados con LPS no se vieron afectados.

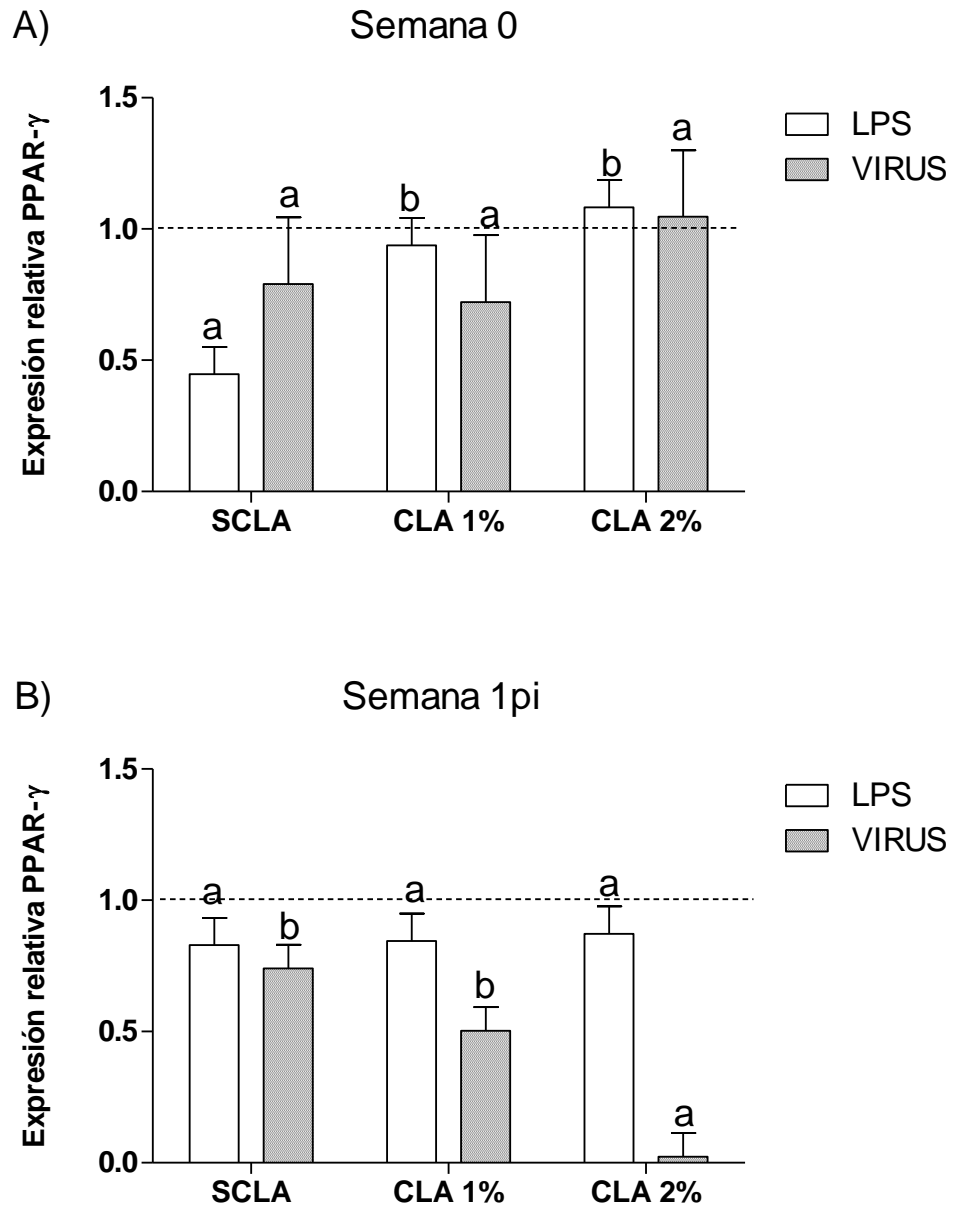


Figura 8. Expresión relativa de RNAm de PPAR- γ en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, reestimuladas *in vitro* con LPS y VIRUS. **A)** Semana 0, **B)** Semana 1pi. La línea punteada muestra el valor de células sin estimular. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), $n = 12$ cerdos (4 por tratamiento). Las diferencias entre las medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

Se ha reportado que el CLA dietario es un potente activador del PPAR- γ y que está asociado con una expresión elevada de genes que son responsables en parte de los PPAR, los cuales están involucrados en la modulación de las actividades de varios factores de transcripción que regulan la expresión de citocinas (Houseknecht y cols., 1998). Estudios realizados en macrófagos murinos con CLA han mostrado que es capaz de activar el PPAR- γ y disminuir la producción de productos proinflamatorios (Yu y cols., 2002).

Además de la activación del PPAR, se ha reportado que CLA induce la expresión del RNAm de PPAR γ . En cerdos infectados con *Brachyspira hyodysenteriae* que fueron alimentados con CLA, aumentó la expresión de PPAR- γ después de la inflamación colónica y su concentración fue mayor que en los cerdos infectados alimentados con la dieta control (Hontecillas y cols., 2002). De igual manera, en cerdos alimentados con CLA se observó que después de un estímulo inflamatorio, la expresión de PPAR- γ aumentó y la síntesis de TNF- α fue disminuida. Además, tras cultivar CMN en medio con los isómeros individuales, la expresión de PPAR- γ fue también mayor en las células suplementadas con *t10*, *c12*-CLA que en las cultivadas en medio con *c9*, *t11*-CLA *in vitro* (Changua y cols., 2005a). El incremento de la expresión de PPAR- γ , se relacionó con la disminución de citocinas pro-inflamatorias, posiblemente debido a que antagoniza con los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Jones y cols., 2002). Nuestros resultados mostraron que de acuerdo a lo reportado, la expresión de PPAR- γ en cerdos sanos con CLA incrementó la expresión de este mediador tras la estimulación con LPS, sin embargo, en el grupo de cerdos infectados, reestimulados con virus y que recibieron la suplementación con CLA disminuyó la expresión de PPAR- γ probablemente por efecto del virus.

Por otro lado, la Figura 9 muestra el efecto de las dietas por semanas sobre la expresión de RNAm de TNF- α tras la estimulación con LPS y virus. La expresión de TNF- α en CMN no se vio modificada significativamente por ninguna de las dietas tras la estimulación con LPS y virus en ninguna de las semanas (Figura 9A y B).

Changua y cols., en el 2005a reportan que en cerdos inyectados con LPS los dos isómeros de CLA, principalmente el *trans*-10, *cis*-12-CLA inhibieron la expresión y producción *in vitro* de TNF- α . De igual manera, en macrófagos RAW264.7 el CLA disminuyó la expresión de RNAm de TNF- α inducida por IFN- γ (Yu y cols., 2002). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la expresión de RNAm de TNF- α en la semana 0 y 1 post-infección no se vio modificada significativamente por el CLA, ni por la estimulación. No obstante, de acuerdo con los reportes, la reestimulación *in vitro* con el virus disminuyó la expresión de TNF- α respecto de las células estimuladas con LPS independientemente de la dieta y del tiempo. Estos datos en cuanto a la expresión de RNAm de TNF- α que no se vieron modificados por efecto del CLA en ninguno de los grupos, y su producción en suero, la cual fue incrementada en cerdos infectados y suplementados, sugieren que posiblemente haya un mecanismo de regulación postranscripcional; sin embargo, es necesario realizar mas experimentos para confirmar dichos resultados.

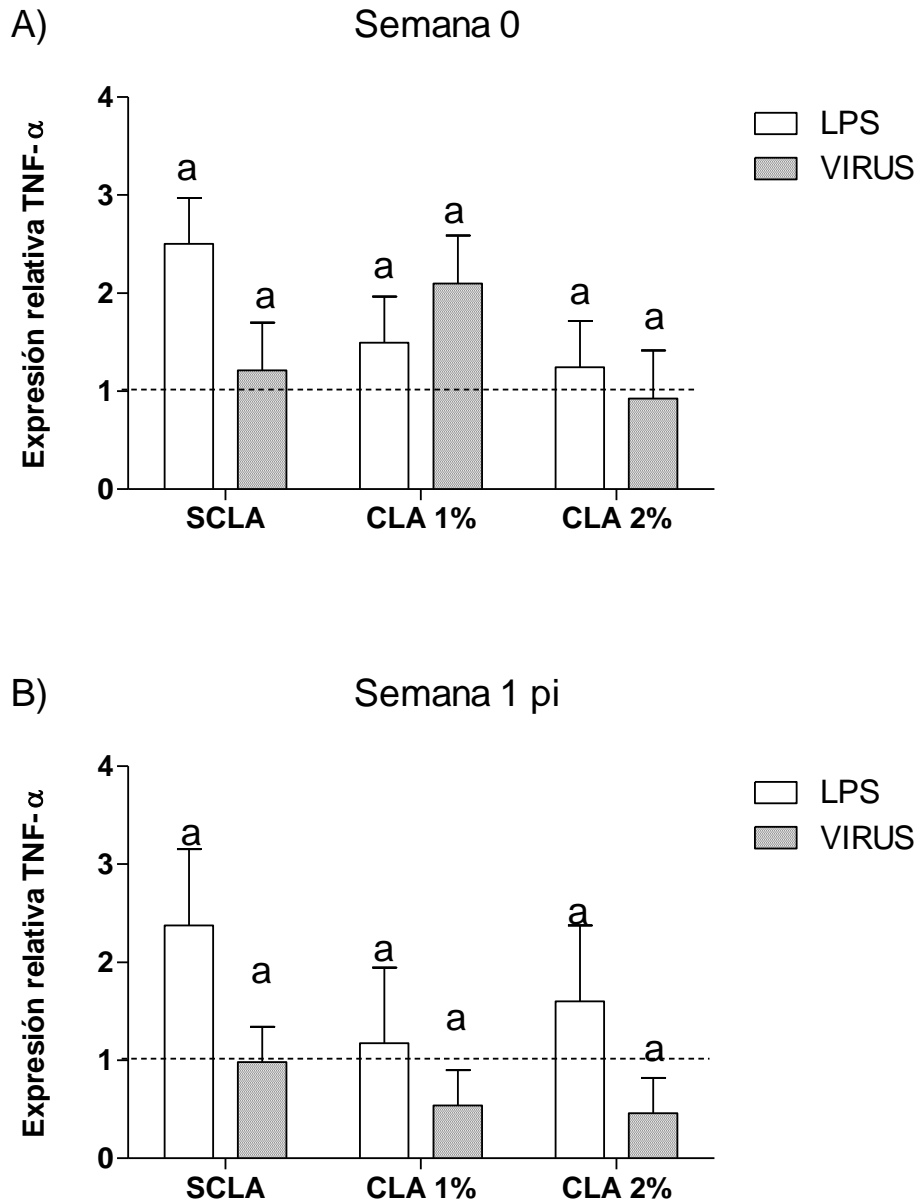


Figura 9. Expresión relativa de RNAm de TNF- α en CMN de cerdos suplementados con CLA1%, CLA 2% y SCLA, reestimuladas *in vitro* con LPS y virus. **A)** Semana 0, **B)** Semana 1pi. La línea punteada muestra el valor de células sin estimular. Literales diferentes entre el mismo estímulo indican diferencias significativas ($P < 0.05$), $n = 12$ cerdos (4 por tratamiento). Las diferencias entre las medias se evaluaron a través de la prueba de Tukey con 95% de confianza.

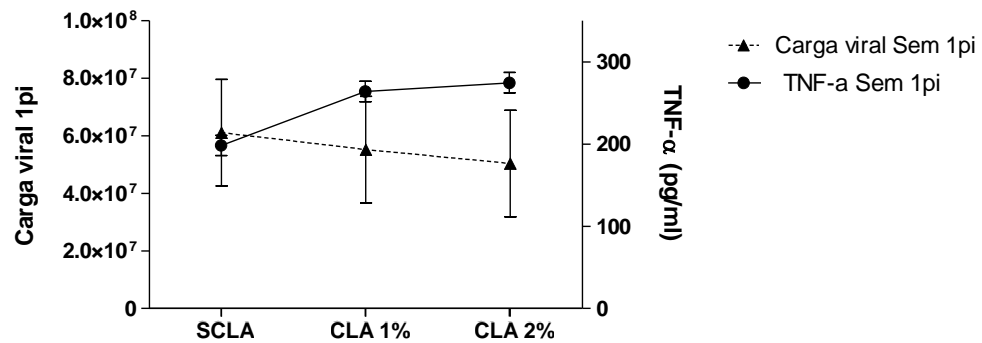
7.3. Carga Viral y TNF- α

Para evaluar si la producción de TNF- α tuvo un efecto en la carga viral, ésta fue determinada a la semana 1 pi y 4 pi. En la Figura 10 se muestran las cargas virales y producción de TNF- α respecto a los tratamientos a la primera semana post-infección (Sem 1pi) y cuarta post-infección (Sem 4pi). A pesar que no se encontró correlación entre las cargas virales de los animales con la producción de TNF- α a ninguna de las semanas independientemente del tratamiento dietario, se puede observar que las cargas virales fueron disminuyendo hacia la semana 4 post-infección en los grupos con dietas con CLA, mientras que la producción de TNF- α en ambas semanas prácticamente se mantuvo.

En la Figura 11 se muestra la carga viral y expresión relativa de RNAm de TNF- α a la primera semana post-infección en CMN de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%) y estimuladas *in vitro* con LPS y virus PRRS. Al igual que con la producción de TNF- α , tampoco se encontró correlación entre la expresión de RNAm de TNF- α en la primera semana post-infección con las cargas virales de la misma semana, independientemente del estímulo. Cabe mencionar que no se determinó la expresión de TNF- α en la semana 4pi por lo que no se correlacionó con esta semana.

En estudios con infecciones experimentales con PRRSV, el pico de título viral se obtiene entre los 7-10 días post-inoculación. Posteriormente, el virus eventualmente se elimina del cuerpo y parece estar en todos los animales después de varios meses post-infección. Este proceso se ha estimado que dura aproximadamente 150 días post-infección o más para eliminar la infección al 100% en los animales (López y cols., 2004).

A)



B)

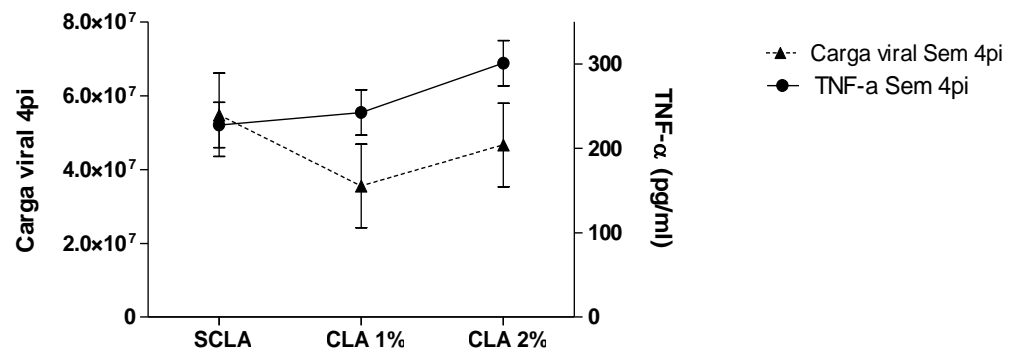
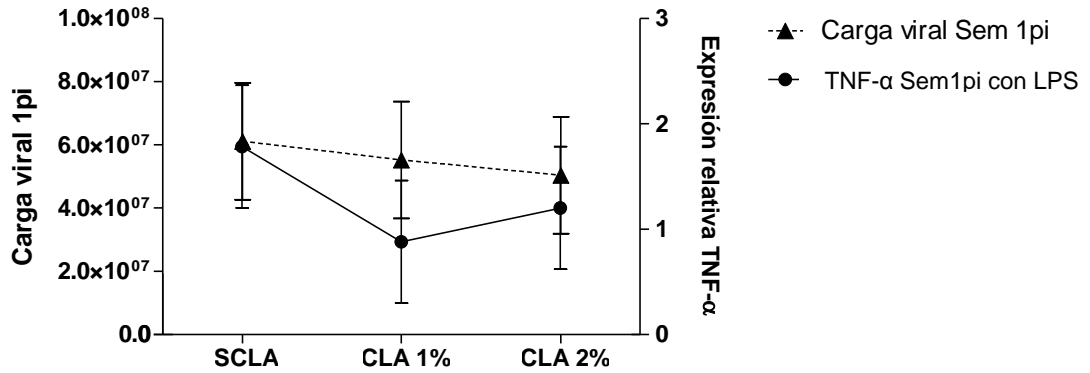


Figura 10. Carga viral y producción de TNF- α en suero de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%) durante: **A)** la primera semana post-infección (Sem 1pi) y **B)** cuarta semana post-infección (Sem 4pi). Se utilizó la prueba de correlación de Pearson, n = 12 cerdos (4 por tratamiento).

A)



B)

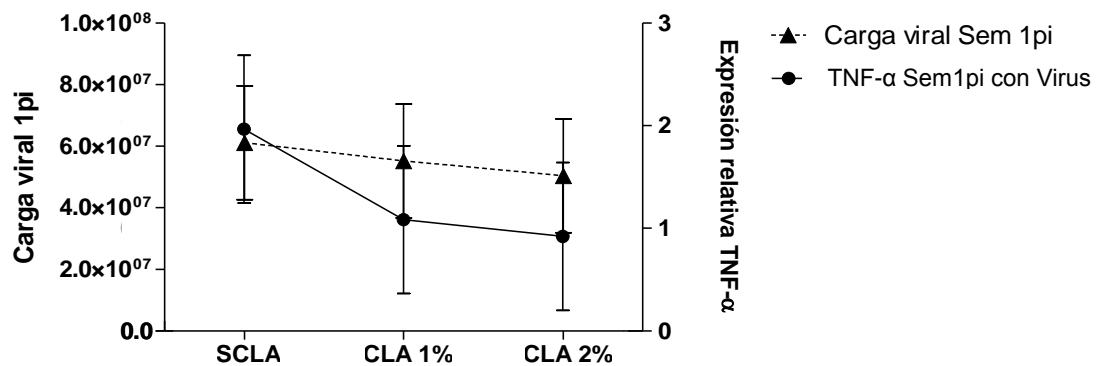


Figura 11. Carga viral y expresión relativa de RNAm de TNF-α a la primera semana post-infección en CMN de cerdos alimentados con dietas sin CLA (SCLA), con 1% de CLA (CLA 1%) y con 2% de CLA (CLA 2%) y estimuladas *in vitro* con LPS y virus PRRS. **A)** Carga viral y expresión relativa de TNF-α en CMN estimuladas con LPS, **B)** Carga viral y expresión relativa de TNF-α en CMN estimuladas con PRRSV. Se utilizó la prueba de correlación de Pearson, n = 12 cerdos (4 por tratamiento).

Así pues, en un estudio se demostró que en cerdos infectados con este virus, la viremia fue prolongada, la respuesta inmune mediada por células fue de corta duración, y hubo un lento desarrollo de células productoras de IFN- γ específicas para el virus (Murthag y cols., 2002). Lo anterior indica que una respuesta inmune innata débil caracterizada por una carencia de TNF- α al tiempo de la infección por PRRSV, conduce a una débil respuesta inmune adaptativa.

En este trabajo, la producción y expresión de TNF- α no correlacionaron con la carga viral de los cerdos en ninguno de los grupos dietarios. Como se puede apreciar, los efectos del CLA sobre la respuesta inmunológica no son uniformes, y estos pudieran deberse no solo a la especie, sino también a la edad de los animales, la duración de la alimentación, si las células son estimuladas o no, al tipo de estimulación y si es *in vivo* o *in vitro*.

Los trabajos que reportan una relación entre los perfiles de citocinas proinflamatorias y la suplementación con CLA en cerdos son muy escasos, y particularmente, este es el primer trabajo en evaluar estas propiedades en cerdos infectados con el virus del PRRS, por lo que es necesario realizar más investigación al respecto.

8. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que el CLA no tuvo efecto sobre los mediadores de inflamación COX-2, iNOS y TNF- α . Sin embargo, la producción de TNF- α se incrementó en suero y la expresión de RNAm de NF- κ B se incrementó en CMN de cerdos infectados con PRRSV alimentados con CLA, en cambio, la expresión de RNAm de PPAR- γ se encontró disminuida en CMN.

El patrón de respuesta al CLA difiere al reportado en trabajos previos; sin embargo, es importante enfatizar que éste, es el primero que involucra la suplementación con CLA en cerdos infectados con PRRSV, lo que sugiere que el virus pudiera ser el responsable de la discrepancia en la respuesta encontrada. Por tal motivo, es necesario realizar más estudios al respecto que apoyen estos resultados.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Akahoshi A, Goto Y, Murao K, Miyazaki T, Yamasaki M, Michiko N, Yamada K, Sugano M. 2002. Conjugated Linoleic Acid Body Fats and Cytokine Levels of Mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 916-920.
- Albina E., Piriou L., Hutet E., Cariolet R., L'Hospitalier R. 1998. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus PRRSV. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 61:49-66.
- Asai T, Mori M, Okada M, Uruno K, Yazawa S, Shibata I. 1999. Elevated Serum Haptoglobin in Pigs Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Imm.* 70: 143-148.
- Bassaganya-Riera J, Pogranichniy RM, Jobgen SC, Albur PG, Yoon KJ, O'Shea M, Mohece I, Hontecillas R. 2003. Conjugated Linoleic Acid Ameliorates Viral Infectivity in a Pig Model of Virally Induced Immunosuppression. *J Nutr.* 133: 3204-3214.
- Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Zimmerman D.R. Wannemuehler M. J. 2001. Dietary Conjugated Linoleic Acid Modulates Phenotype and Effector Functions of Porcine CD8 Lymphocytes. *American Society for Nutritional Sciences.* 2370-2377
- Belury MA. 2002. Dietary Conjugated Linoleic Acid in Health: Physiological Effects and Mechanisms of Action. *Ann Rev Nutr.* 22: 505-531.
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robinson D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. 1992. Characterization of Swine Infertility and Respiratory Syndrome Virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest.* 4: 127-133.
- Carreón NR, Ramirez MH, Mercado GC, Soto M. 1999. Detección de anticuerpos contra el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio de Cerdos en Diferentes Estados de la República Mexicana. *Memorias XXXIV Congreso Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; Mérida (Yucatán) México. AMVEC.* 168-169.
- Changua L, Yin J. 2005a. Conjugated Linoleic Acid Attenuates the Production and Gene Expression of Proinflammatory Cytokines in Weaned Pigs Challenged with Lipopolysaccharide. *J Nutr.* 6: 239-244.

- Changua L, Yin J, Li D, Zhao L, Chen X. 2005b. Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Performance and Immune Function of Weaned Pigs. *Arch Anim Nutr.* 59: 41-51.
- Chareerntantanakul W, Platt R, Roth JA. 2006. Effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Infected Antigen-Presenting Cells on T Cell Activation and Antiviral Cytokine Production. *Viral Immunol.* 19: 646-61.
- Chen BQ, Xue YB, Liu JR, Yang YM, Zheng YM, Wang XL, Liu RH. 2003. Inhibition of Conjugated Linoleic Acid on Mouse Forestomach Neoplasia Induced by Benzo (a) pyrene and Chemopreventive Mechanisms. *World J Gastroenterol.* 9: 44-49.
- Chew BP, Wong TS, Shultz TD, Magnuson NS. 1997. Effects of Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid and B-carotene in Modulating Lymphocyte and Macrophage Function. *Anticancer Res.* 17: 1099-1107.
- Chiou M. T., Jeng C. R., Chueh L. L., Cheng C. H., Pang V. F. 2000. Effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (isolate tw91) on Porcine Alveolar Macrophages in vitro. *Veterinary Microbiology.* 71: 9-25.
- Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, Thiel HJ. 1993. Molecular Characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, a Member of the Arterivirus Group. *Virology.* 193: 329-339.
- Corinti S, Albanesi C, Sala A, Pastore S, Girolomoni G. 2001. Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Functions. *J Immunol.* 166:4312-8.
- Corino C, Bontempo V, Sciannimanico D. 2002. Effects of Dietary Conjugated Linoleic Acid on Some Aspecific Immune Parameters and Acute Phase Protein in Weaned Pigs. *Can J Anim Sci.* 82:115-7.
- Christopher-Hennings, J., Dammen, M., Nelson, E., Rowland, R., Oberst, R., 2006. Comparison of RNA Extraction Methods for the Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus from Boar Semen. *J. Virol. Methods.* 136 (1-2), 248-253.
- Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. 2006. Different European-type Vaccines Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus have Different Immunological Properties and Confer Different Protection to Pigs. *Virology.* 351:249-59.

- Dugan MER, Aalhus JL, Kramer JKG. 2004. Conjugated Linoleic Acid Pork Research. *Am J Clin Nutr.* 79: 1212S– 6S.
- Feng W.H., Tompkins M.B., Xu J.S., Zhang H.X., McCaw M.B. 2003. Analysis of Constitutive Cytokine Expression by Pigs Infected in-utero with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 94: 35–45
- Flores-Mendoza LK, Silva-Campa E, Reséndiz M, Osorio FA, Hernández J. 2008. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infects Mature Porcine Dendritic Cells and up-regulates IL-10 Production. *Clin Vaccine Immunol.* 720–725.
- Gil-Salido AA. 2006. Producción de Citocinas en Células Mononucleares (CMN) de Cerdo Suplementados In Vitro con Ácido Linoleico Conjugado (CLA). Tesis de Maestría CIAD A.C. Hermosillo, Sonora, México. 1-45.
- Gómez-Laguna J., Salguero F. J., Fernández De Marco M., Pallarés FJ., Bernabé A., Carrasco L. 2009. Changes in Lymphocyte Subsets and Cytokines During European Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: Increased Expression of IL-12 and IL-10 and Proliferation of CD4 CD8 high. *Viral Immunology.* 22: 261-271.
- Harris S, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R. 2002. Prostaglandins as Modulators of Immunity. *Immunol.* 22: 144-150.
- Hayek MG, Han SN, Wu D, Watkins BA, Meydani M, Dorsey JL, Smith Donald E, Meydani SN. 1999. Dietary Conjugated Linoleic Acid Influences the Immune Response of Young and Old c57bl/6ncrlbr Mice. *J Nutr.* 129: 32-38.
- Hontecillas R, Wannamuelher MJ, Zimmerman DR, Hutto DL, Wilson JH, Ahn DU, Bassaganya-Riera J. 2002. Nutritional Regulation of Porcine Bacterial-Induced Colitis by Conjugated Linoleic Acid. *J Nutr.* 132: 2019-2027.
- Houseknecht K. L., Bidwell C. A., Portocarrero Carla P., Spurlock Michael E. 1998. Expression and cDNA cloning of porcine peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARc). *Gene* 225: 89–96.
- Iwakiri Y, Sampson DA, Allen KGD. 2002. Suppression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Conjugated Linoleic Acid in Murine Macrophages. *PLEFA.* 67: 435-443.

- Jones D, Manning B, Daynes R. 2002. A Role for the Peroxisome Proliferators-Activated Receptor- α in T-cell Physiology and Ageing Immunobiology. *Proc Nutr Soc.* 61: 363-369.
- Kelly GS. 2001. Conjugated Linoleic Acid: A Review. *Altern Med Rev.* 6: 367-382.
- Kim YJ, Liu RH, Bond DR, Russell JB. 2000. Effect of Linoleic Acid Concentration on Conjugated Linoleic Acid Production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl Environ Microbiol.* 12: 5226-5230.
- Labarque G, Van GS, Nauwynck H, Van Reeth K, Pensaert M. 2003. Apoptosis in the Lungs of Pigs Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Associations with the Production of Apoptogenic Cytokines. *Vet Res.* 34(3):249-60.
- Lee SH, Yamaguchi K, Kim JS, Eling TE, Safe S, Park Y, Joon BS. 2006. Conjugated Linoleic Acid Stimulates an Anti-tumorigenic Protein NAG-1 in an Isomer Specific Manner. *Carcinogenesis.* 27: 972–981.
- Li G, Barnes D, Butz D, Bjorling D, Cook ME. 2005. 10t,12c-Conjugated Linoleic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-induced Cyclooxygenase Expression in vitro and in vivo. *J Lipid Res.* 46: 2134–2142.
- Lopez O.J., Osorio F.A. 2004. Role of Neutralizing Antibodies in PRRSV Protective Immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102: 155–163.
- Lopez-Fuertes L., Campos E, Domenech N, Ezquerro A, Castro J.M., Dominguez J., Alonso F. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF- α production in infected macrophages. *Virus Res.* 69:41–46.
- Loving CL, Brockmeier SL, Sacco RE. 2007. Differential Type I Interferon Activation and Susceptibility of Dendritic Cell Populations to Porcine Arterivirus. *Immunol.* 120: 217-229.
- Loving CL, Brockmeier SL, MA W, Richt JA, Sacco RE. 2006. Innate Cytokine Responses in Porcine Macrophage Populations: Evidence for Differential Recognition of Double-Stranded RNA. *J Immunol*; 177:8432-8439.
- Luongo D, Bergamo P, Rossi M. 2003. Effects of Conjugated Linoleic Acid on Growth and Cytokine Expression in Jurkat T Cells. *Immunol Lett.* 90: 195-201.

- Malovrh T, Kompan L, Juntos P, Wraber B, Spindler-Vesel A, Kompan D. 2009. Influence of Conjugated Linoleic Acid on the Porcine Immune Response and Morbidity: a Randomized Controlled Trial. *Lipids in Health and Disease*. 8:22.
- Mardassi H, Massie B, Dea S. 1996. Intracellular Synthesis, Processing, and Transport of Proteins Encoded by ORFs 5 to 7 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virology*. 221: 98–112.
- Martinez P, Ortega ME, Gallego CAM, Alvarez NC, Alvarez de Cienfuegos LG. 2000. Inmunomodulación Ejercida por los Ácidos Grasos de la Dieta en Animales de Experimentación y Humanos. *Grasas y Aceites*. 51: 190-195.
- Mateu E, Díaz I. 2007. The Challenge of PRRS Immunology. *Vet J*. 30: 1-7.
- Meier WA, Galeota J, Osorio FA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. 2003. Gradual Development of the Interferon-gamma Response of Swine to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection or Vaccination. *Virology*. 309: 18-31.
- Mengeling WL, Langer KM, Vorwald AC. 2000. The Effect of Porcine Parvovirus and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on Porcine Reproductive Performance. *Anim Reprod Sci*. 60: 199-210.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol*. 19: 683-765.
- Moya-Camarena S, Vanden Heuvel J, Blanchard S, Leesnitzer L, Belury M. 1999. Conjugated Linoleic Acid is a Potent Naturally Occurring Ligand and Activator of PPAR α . *J Lipid Res*. 40: 1426-1433.
- Murtaugh MP, Xiao Z, Zuckermann F. 2002. Immunological Responses of Swine to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection. *Viral Immunol*. 15: 533-47.
- Neumann J, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *JAVMA*. 227 (3): 385-392.
- Osorio F. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *IPVS*. 1-9.

- Pariza M, Park Y, Cook M. 2000. Mechanism of Action of Conjugated Linoleic Acid: Evidence and Speculation. PSEBM. 223: 8-13.
- Park Y, Yang M, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Cook ME, Pariza MW. 2007. Effects of Conjugated Linoleic Acid Isomers on Serum Tumor Necrosis Factor- α Concentration in Mice. J Food Biochem. 31: 252-265.
- Peralta-Quintana JR. 2008. Efecto *in vitro* de los Isómeros del Ácido Linoleico Conjugado (CLA) sobre la Proliferación de Linfocitos T CD4 y CD8 de Cerdo. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 1-42.
- Quintana EJA. 2006. Efecto de los Isómeros del CLA Sobre la Proliferación de Células Mononucleares de Cerdo. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 1-51.
- Royae AR, Husmann RJ, Dawson HD, Calzada-Nova G, Schnitzlein WM, Zuckerman FA, Lunney JK. 2004. Deciphering the Involvement of Innate Immune Factors in the Development of the Host Response to PRRSV Vaccination. Vet Imm. 102: 199-216.
- Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR, Houseknecht KL. 2001. Isomer-specific Antidiabetic Properties of Conjugated Linoleic Acid Improved Glucose Tolerance, Skeletal Muscle Insulin Action and UCP-2 Gene Expression. Diabetes. 50: 1149-57.
- Silva-Campa E, Flores-Mendoza L, Reséndiz M, Pinelli-Saavedra A, Mata-Haro V, Mwangi W, Hernández J. 2009. Induction of T helper 3 Regulatory Cells by Dendritic Cells Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Virol. 7: 1-7.
- Sipos, W., Duvigneau, C., Pietschmann, P., Holler, K., Hartl, R., Wahl, K., Steinborn, R., Gemeiner, M., Willheim, M., Schmoll, F., 2003. Parameters of humoral and cellular immunity following vaccination of pigs with a European modified-live strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Viral Immunology 16: 335–346.
- Song H.J, Grant I, Rotondo D, Mohede I, Sattar N, Heys SD, Wahle KWJ. 2005. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. European Journal of Clinical Nutrition. 59: 508–517.
- Steinhart C. 1996. Conjugated Linoleic Acid-The Good News About Animal Fat. J Chem Ed. 73: 302-303.

- Suárez FP. 1995. Genética Molecular del Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino: Aspectos Evolutivos, Diagnósticos e Inmunógenos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 19-32.
- Subramaniam S., Kwon B., Beura L.K., Kuszynski C.K., Pattnaik A.K., Osorio F.A. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor-alpha promoter activation by inhibiting NF- κ B and Sp. *Virology* 406: 270–279.
- Suradhat S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y. 2003. Upregulation of IL-10 Gene Expression in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Gen Virol.* 84: 453-9.
- Thanawongnuwech R., Thacker B., Halbur P., Thacker E. L. 2004. Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 901–908.
- Thanawongnuwech R., Young T. F., Thacker B. J., Thacker E. L. 2001. Differential Production of Proinflammatory Cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 79: 115-127.
- Turek JJ, Li Y, Schoenlein IA, Allen KGD, Watkins BA. 1998. Modulation of Macrophage Cytokine Production by conjugated linoleic Acids is Influenced by the Dietary n-6:n-3 Fatty Acid Ratio. *J Nutr Biochem.* 9: 258-266.
- Uauy DR, Martinez AJI, Rojas SBCV. 2000. Regulation of Lipid Metabolism by Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPAR). Their Relation Ship to Obesity and Mellitus. *Rev Med Chile.* 128: 437-446.
- Van Reeth K, Labarque G, Nauwynck H, Pensaert M. 1999. Differential Production of Proinflammatory Cytokines in the Pig Lung During Different Respiratory Virus Infections: Correlations with Pathogenicity. *Res Vet Sci.* 67(1):47-52.
- Wang X, Eaton MM, Li H, He D, Nelson E, Christopher-Hennings J. 2007. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Productively

- Infects Monocyte-derived Dendritic Cells and Compromises their Antigen-presenting Ability. *Arch Virol.* 152: 289-303.
- Wen-Ling C, Chong-Kuei L, Haw-Wen C, Ting-Hui L, Kai-Li L. 2004. Contribution of Conjugated Linoleic Acid to the Suppression of Inflammatory Responses through the Regulation of the NF- κ B Pathway. *J Agric Food Chem.* 52 (1): 71-78.
- West DB, Blohm FY, Truett AA, Delany JP. 2000. Conjugated Linoleic Acid Persistently Increases Total Energy Expenditure in AKR/J Mice Without Increasing Uncoupling Protein Gene Expression. *J Nutr.* 130: 2471-2477.
- Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings. 2001. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virol.* 287:183-191.
- Yamasaki M, Chujo HH, Koyanagi N, Okamoto T, Tojo N, Oishi A, Iwata T, Yamauchi SY, Yamamoto T, Tsutsumi K, Tachibana H, Yamada K. 2003. Immunoglobulin and Cytokine Production from Spleen Lymphocytes is Modulated in C57BL/6J Mice by Dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 Conjugated Linoleic Acid. *J Nutr.* 133: 784-788.
- Yang M. and Cook M.E. 2003. Dietary Conjugated Linoleic Acid Decreased Cachexia, Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production, and Modifies Splenocyte Cytokines Production. *Exp Biol Med* 228:51-58.
- Yu Y, Correll PH, Vanden Heuvel JP. 2002. Conjugated Linoleic Acid Decreases Production of Pro-inflammatory Products in Macrophages: Evidence for a PPAR γ -dependent Mechanism. *Mol Cell Biol.* 1581: 89-99.

