

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

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS MONONUCLEARES
(CMN) DE CERDO SUPLEMENTADOS *IN VITRO* CON ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO (CLA)

POR:

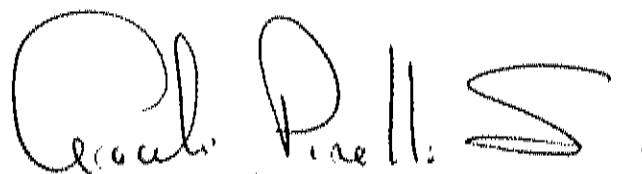
ARMIDA ANDREA GIL SALIDO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

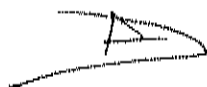
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Armida Andrea Gil Salido, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

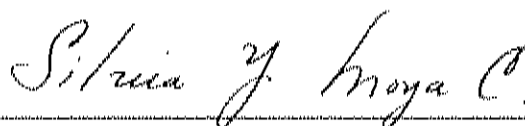


Dra. Araceli Pinelli Saavedra

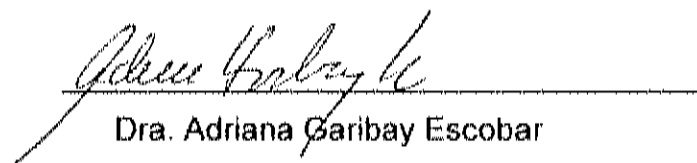
Director de Tesis



Dr. Jesús Hernández López



Dra. Silvia Yolanda Moya Camarena

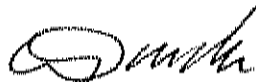


Dra. Adriana Garibay Escobar

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. Alfonso Gardea Béjar

Director General

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la sabiduría y los medios para culminar una etapa más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización del estudio.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD, AC) por permitir mi desarrollo académico y profesional en sus instalaciones.

Al equipo del laboratorio Ramos, por darnos las facilidades para la realización de este proyecto.

A la Dra. Araceli Pinelli por brindarme su apoyo y abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia y confianza.

A mi comité de tesis: Dr. Jesús Hernández, Dra. Silvia Moya Camarena y Dra. Adriana Garibay Escobar, por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio de Inmunología, así como a la Coordinación de Nutrición.

Este trabajo fue financiado por Fondos Sectoriales de Investigación
Ciencia Básica SEP-CONACYT Proyecto No. P 50724 .

DEDICATORIAS

A mi mamá, por su gran apoyo, comprensión y ejemplo a seguir. Por enseñarme que en las caídas solo hay que levantarse y continuar

A mi papá, que con su partida me enseñó a ser fuerte ante las adversidades.

A Carlos, por su amor, apoyo, paciencia y comprensión en todo momento, por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Andrea Amell, por ser mi gran tesoro y mi mayor impulso para salir adelante.

A mi mamanina, por su cariño, su apoyo y sus sabios consejos.

A todos mis amigos, en especial a Maritza, Mónica, Ana, Cipactli, Bibiana, Teresita, Oralia, Javier, Esperanza, Karlita y Noel.

"La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante"

ÍNDICE

| | Página |
|---|---------------|
| INDICE DE FIGURAS | ix |
| INDICE DE TABLAS | x |
| RESUMEN | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1. Ácido linoleico conjugado (CLA) | 2 |
| 2.1.1. Síntesis del CLA | 2 |
| 2.1.1.1. Síntesis química | 2 |
| 2.1.1.2. Síntesis en rumiantes | 3 |
| 2.1.1.3. Síntesis endógena en tejidos de rumiantes | 3 |
| 2.1.1.4. Síntesis en cerdos | 4 |
| 2.1.2. Metabolismo | 4 |
| 2.1.3. Propiedades fisiológicas del CLA | 5 |
| 2.2. Acción inmunomoduladora del CLA | 5 |
| 2.2.1. CLA y citocinas pro-inflamatorias | 5 |
| 2.2.2. CLA y proliferación de linfocitos | 7 |
| 2.3. Mecanismos bioquímicos de regulación del sistema inmune mediados por el CLA | 11 |
| 2.3.1. Modulación del sistema inmune dependiente de eicosanoides | 11 |
| 2.3.2. Modulación del sistema inmune dependiente de PPAR | 14 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 16 |
| 4. HIPÓTESIS | 17 |
| 5. OBJETIVOS | 17 |
| 5.1. General | 17 |

| | Página |
|---|---------------|
| 5.2. Particulares | 17 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 6.1. Animales de experimentación | 18 |
| 6.2. Cultivo celular y suplementación | 18 |
| 6.3. Detección de las citocinas IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10 por citometría de flujo | 19 |
| 6.4. Extracción de RNA total | 19 |
| 6.5. Síntesis de DNA complementario (DNAc) | 20 |
| 6.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real | 21 |
| 6.7. Análisis estadístico | 23 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 24 |
| 7.1. Producción de citocinas tipo Th1/Th2 por CMN suplementadas con CLA y estimuladas con PHA | 24 |
| 7.2. Expresión del RNAm de las citocinas tipo Th1/Th2 de CMN suplementadas con CLA y estimuladas con PHA | 32 |
| 8. CONCLUSIONES | 37 |
| 9. REFERENCIAS | 38 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. El CLA compite con el ácido linoleico en la síntesis de eicosanoides | 13 |
| Figura 2. Porcentaje de CMN productoras de INF- γ estimuladas con PHA (10 μ M) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos. | 25 |
| Figura 3. Porcentaje de CMN productoras de IL-2 estimuladas con PHA (10 μ M) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos. | 27 |
| Figura 4. Porcentaje de CMN productoras de IL-4 estimuladas con PHA (10 μ M) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos. | 29 |
| Figura 5. Porcentaje de CMN productoras de IL-10 estimuladas con PHA (10 μ M) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos. | 30 |
| Figura 6. Incremento relativo de los transcritos de IL-2, INF- γ , IL-10, IL-12 y PPAR- γ de CMN suplementadas con una mezcla 1:1 de CLA (100 μ M), durante 24 horas respecto a CMN no suplementadas. | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabla 1. Secuencias de iniciadores y sondas | 22 |

RESUMEN

En la industria porcina se están buscando estrategias para que a través de la alimentación se mejore el sistema inmune del cerdo. Una de estas medidas es el uso del ácido linoleico conjugado (CLA). El término CLA se refiere a una mezcla de isómeros del ácido linoleico, en los que la posición de los dobles enlaces se separa por un enlace sencillo. Se ha observado que el CLA tiene efectos sobre algunas variables de la respuesta del sistema inmune (proliferación celular, inmunoglobulinas, citocinas pro-inflamatorias). Estos efectos podrían beneficiar al cerdo, mejorando su sistema inmune y por ende su salud, dando por resultado mayores ganancias para la industria porcícola. Sin embargo, los estudios con CLA y la producción de citocinas Th1 y Th2 son escasos e inconsistentes, siendo importante su modulación para montar una buena respuesta inmune. Es por ello que en este trabajo se evalúa el efecto *in vitro* de los isómeros del CLA en la producción de las citocinas Th1 (INF- γ , IL2) y Th2 (IL4, IL10) del cerdo. Para este propósito, se utilizaron células mononucleares (CMN) estimuladas con fitohemaglutina (PHA) e incubadas con 0, 10 y 100 μ M de los isómeros *9c11l*-CLA, *10t12c*-CLA y una mezcla (1:1) de éstos. Las citocinas se cuantificaron por citometría de flujo y el RNAm de las mismas se cuantificó por PCR en tiempo real. No se encontró efecto significativo del CLA sobre la producción de citocinas, pero se observa una disminución en la expresión de transcritos IL2, IL12 e INF- γ , y un aumento en la IL10 y en el receptor PPAR- γ , sugiriendo que el CLA posee un efecto anti-inflamatorio y una tendencia de polarizar la respuesta hacia las citocinas tipo Th2.

1. INTRODUCCIÓN

En la producción porcina se requieren alternativas que ayuden a mejorar la respuesta inmune ante infecciones, para controlar y prevenir enfermedades. Además, el obtener animales con mejores respuestas inmunes se reflejará en que los costos por medicamentos se disminuyan y se aumente la eficiencia en la ganancia de peso. Por otro lado, debido a la resistencia que presentan las bacterias frente a los antibióticos, el uso de éstos, así como de promotores de crecimiento está cada vez más restringido a nivel mundial. Actualmente la Unión Europea ha prohibido el uso de antibióticos y los Estados Unidos de América tienden a implementar políticas similares, lo que pondrá a México en un escenario similar. Dentro de las alternativas a esta restricción se encuentran algunos nutrimentos capaces de estimular y mejorar el funcionamiento del sistema inmune, como es el ácido linoleico conjugado (CLA por siglas en inglés) (Weber *et al.*, 2001; Bassaganya-Riera *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2005a).

El término CLA se refiere a una mezcla de isómeros de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (18:2), que han mostrado en diversos estudios con mamíferos, mejora algunos parámetros de la respuesta inmune. Sin embargo, los estudios realizados a la fecha en cerdo son muy pocos y están enfocados principalmente a la producción de citocinas pro-inflamatorias, a la producción de inmunoglobulinas y a la proliferación de linfocitos T CD8⁺ (Lai *et al.*, 2005b; Bassaganya-Riera *et al.*, 2001 y 2003; Corino *et al.*, 2001). Además, los estudios encaminados a evaluar la respuesta Th1 y Th2 son muy pocos e inconsistentes. Por ello, es importante realizar estudios que permitan evaluar el efecto del CLA sobre la modulación de estas respuestas en el sistema inmune el cerdo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ácido linoleico conjugado (CLA)

El CLA es una mezcla de isómeros geométricos y de posición del ácido linoleico, el cual posee dos insaturaciones. El CLA se forma cuando cambia la localización de uno de estos dobles enlaces de manera que se separen por un enlace sencillo. A este tipo de moléculas, químicamente se les llama conjugadas. Dependiendo de la posición de los dobles enlaces, se han encontrado al menos 8 diferentes isómeros del CLA, de los cuales los principales isómeros dietarios son el *9c,11t* y el *10c,12t*. Éstos son los que presentan la mayor actividad biológica. También existen los isómeros 8 y 10 u 11 y 13, que se encuentran en preparaciones comerciales en cantidades muy bajas, pero en estudios biológicos pueden complicar la interpretación de los resultados. Así mismo, el hecho de que el CLA se encuentre en forma de mezcla de isómeros, pudiera ocasionar que éstos presentaran sinergismo o efectos antagónicos (Corino *et al.*, 2001; Belury, 2002; Kelly, 2001; MacDonald, 2000; Pariza *et al.*, 2001; Albers *et al.*, 2003; Kelley *et al.*, 2002; Khanal y Dhiman, 2004).

2.1.1. Síntesis del CLA

El CLA puede sintetizarse a través de diferentes procedimientos, ya sea de manera natural en rumiantes, o bien, químicamente (Khanal y Dhiman, 2004).

2.1.1.1. Síntesis química. La producción de CLA en grandes cantidades puede realizarse a través de síntesis química, mediante el calentamiento del ácido

linoleico en presencia de un álcali fuerte. Esta síntesis produce una mezcla compleja que contiene principalmente *9c,11t*-CLA y *10c,12t*-CLA en proporción 1:1, y posee una máxima actividad biológica. También se forman pequeñas cantidades de otros isómeros del CLA; el número de isómeros formados dependerá de la severidad del álcali (Pariza *et al.*, 2001).

2.1.1.2. Síntesis en rumiantes. El CLA se puede producir a partir de los ácidos grasos poli-insaturados ingeridos en la dieta, como el ácido linolénico y el linoleico, siendo el último el principal precursor. El ácido linoleico sufre una isomerización formando el *9c,11t*-CLA. La isomerasa es producida por *Butyrivibrio fibrisolvens*, bacteria perteneciente a la flora normal de rumen. El *9c,11t* formado puede ser directamente absorbido en el rumen o puede ser bi-hidrogenado a *11-trans* octadecanoico (TVA). Por último el TVA es reducido a ácido esteárico, o también puede acumularse en el rumen y ser absorbido en el intestino para incorporarse a diferentes tejidos. El isómero *10c,12t* se forma a partir del ácido linoleico por acción de la isomerasa producida por *Propionibacter sp.* Este isómero es bi-hidrogenado y convertido en ácido *10-trans* octadecanoico, y es absorbido en los tejidos de manera análoga al TVA (Pariza *et al.*, 2001; Pariza *et al.*, 2000; Kepler *et al.*, 1966).

2.1.1.3. Síntesis endógena en tejidos de rumiantes. El TVA es absorbido por las células de los tejidos mamario y adiposo, principalmente, en donde es convertido nuevamente a *9c,11t* por la enzima Δ -9 desaturasa. En el caso del ácido *10-trans* octadecanoico ocurren las mismas reacciones de desaturación, pero algunos mamíferos no poseen la Δ -12 desaturasa para convertirlo en *10c,12t*-CLA (Khanal y Dhiman, 2004; Pariza *et al.*, 2001).

Tanto la síntesis en el rumen como la endógena en tejidos conducen principalmente a la formación de *9c,11t*-CLA (80-90% del total del CLA

formado). El origen de otros isómeros es desconocido pero se cree que es el resultado del metabolismo incompleto por parte de las bacterias del rumen (Khanal y Dhiman, 2004; O'shea *et al.*, 2004; Wahle *et al.*, 2004).

2.1.1.4. Síntesis en cerdos. Los cerdos son animales monogástricos y su estómago contiene pocos microorganismos comparados con los rumiantes. Además, el estómago de los cerdos tiene un mayor índice de paso que el de los rumiantes, lo que limita la hidrogenación gástrica de los ácidos grasos y la producción de CLA. En consecuencia solo una pequeña cantidad de CLA es producido por medio de hidrogenación bacteriana en cerdos, por lo que estos poseen solo una pequeña cantidad de CLA (0.1-0.2 mg/g ácidos grasos). Por ello, el cerdo es un buen candidato para suplementar con CLA. Éste se deposita en los tejidos del cerdo con una eficiencia relativamente alta, por lo que su carne puede llegar a ser fuente fisiológicamente significativa de CLA para el consumo humano (Dugan *et al.*, 2004).

2.1.2. Metabolismo

El CLA se incorpora en los fosfolípidos de las membranas celulares en numerosos tejidos, con lo que modifica su fluidez y se alteran algunos eventos en la traducción de señales, además de la interferencia en la síntesis de eicosanoides. Los principales tejidos en donde se almacena el *9c,11t* son en los fosfolípidos del hígado, piel, hueso, músculo y glándula mamaria. En cambio, el *10c,12t* se almacena preferentemente en lípidos neutros de músculo y glándula mamaria. Este último al parecer tiende a metabolizarse más rápido que el *9c,11t* ya que su incorporación es menor en las membranas de los tejidos (Belury, 2002; Pariza *et al.*, 2000; Wahle *et al.*, 2004).

2.1.3. Propiedades fisiológicas del CLA

Se ha reportado que el CLA tiene una gran variedad de propiedades benéficas en diferentes especies animales de experimentación (ratas, cobayos, cerdos y gallinas) y en humanos. Estos efectos son: anticancerígeno, antiaterogénico, antiobesidad, y acciones antidiabetogénicas. Aumenta la masa corporal libre de grasa y la masa ósea mientras disminuye la masa grasa influyendo de esta manera en la composición corporal. Además tiene efectos sobre el sistema inmune y en los procesos inflamatorios (Kelly, 2001; Albers *et al.*, 2003; Pariza *et al.*, 2000; Belury, 2002; Moya-Camarena *et al.*, 1999; Houseknecht *et al.*, 1998).

2.2. Acción inmunomoduladora del CLA

Hay varios estudios que sugieren que el CLA puede modular el sistema inmune mejorando algunos de sus parámetros, como producción de citocinas, producción de inmunoglobulinas y proliferación de linfocitos (Yamasaki *et al.*, 2003; Kelley *et al.*, 2002, Loungo *et al.*, 2003). Los estudios realizados hasta la fecha se han llevado a cabo en ratas, humanos y otras especies animales, entre ellas el cerdo. Sin embargo, en este último los reportes son escasos.

2.2.1. CLA y citocinas pro-inflamatorias

Las citocinas pro-inflamatorias son el factor de necrosis tumoral α (TNF- α por sus siglas en inglés), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), las cuales se caracterizan porque al producirse en respuesta a un antígeno, inducen una respuesta inflamatoria. La IL-6 estimula la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos (involucradas en la inflamación), y la proliferación de los linfocitos B. La IL-1 β , por su parte, y al igual que el TNF- α , media la

respuesta inflamatoria del huésped a las infecciones y a otros estímulos inflamatorios. Tanto la IL-1 β como el TNF- α , tienen la capacidad de producir fiebre e inducir la síntesis de proteínas plasmáticas de fase aguda; pero se sabe que el TNF- α causa efectos inflamatorios más severos que la IL-1 β . La producción de fiebre y de inflamación como respuesta al TNF- α y a la IL-1 β está mediada por el aumento de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂). La producción de ésta, de acuerdo a evidencias, se sugiere que es modulada a su vez por el CLA (Pariza *et al.*, 2000; O'shea *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2002; Wahle *et al.*, 2004).

La respuesta inflamatoria, debido a la cantidad de antígeno presente y a la función de las citocinas pro-inflamatorias, puede llegar a ser exagerada. En estos casos se pueden producir ciertas enfermedades en el hombre, como artritis reumatoide, asma, glomerulonefritis, enfisema e infarto al miocardio, entre otras. En los cerdos se produce pérdida de peso y disminución del apetito, disminuyendo la producción porcina. Por ello resulta conveniente lograr reducir estos efectos adversos de la inflamación, mejorando con ello la respuesta inmune (Lawrence *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2001).

Se han realizado algunos estudios para evaluar la producción de citocinas pro-inflamatorias. En uno de éstos, llevado a cabo por Lai *et al.* (2005b), se encontró una reducción en la producción de citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en cerdos suplementados con CLA, y desafiados con lipopolisacárido (LPS). Además ellos reportaron un incremento en la producción de IL-10, que es una citocina anti-inflamatoria del tipo Th2, y una disminución de la PGE₂. También observaron un aumento en la expresión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés) subtipo γ , en bazo y timo. Los autores sugieren que el incremento en este receptor podría deberse, en parte, a que a través de él se lleva a cabo un posible mecanismo

de regulación para la producción de citocinas pro-inflamatorias. Por otro lado, Kelley *et al.* (2002), reportaron que al suplementar con CLA linfocitos de bazo de ratones C57BL/6N había un incremento en la producción de TNF- α e IL-6. Además, en un estudio realizado por Akahoshi *et al.* (2002), se observó una elevada producción de TNF- α en ratones suplementados con CLA. Estos resultados sugieren que el CLA modula la producción de citocinas pro-inflamatorias, pero aún no se conoce bien su participación.

2.2.2. CLA y proliferación de linfocitos

Los linfocitos se dividen en dos grandes grupos, los linfocitos B (LB) y los linfocitos T (LT), ambos pertenecen a la respuesta inmune adaptativa de los mamíferos. Los LB actúan en la defensa contra microorganismos extracelulares (bacterias) y secretan inmunoglobulina A (IgA), IgE, IgM, IgG e IgD. Los LT actúan en la defensa contra microorganismos intracelulares (virus) y extracelulares, se clasifican en linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y linfocitos T cooperadores (Th o CD4⁺). Estos últimos a su vez, en base a las citocinas que producen, se clasifican en Th1 y Th2. Los linfocitos Th1 secretan interferón gamma (INF- γ) e IL-2; los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10 principalmente (Abbas *et al.*, 2002).

Un aumento en la población de linfocitos se traduce en una respuesta inmune eficaz. Un estudio en ratones Balb/c mostró que el CLA aumentó la proliferación de linfocitos de bazo previamente estimulados con el mitógeno Pokeweed, y aumentó la producción de IL-2 (Sugano *et al.*, 1999). Resultados similares fueron los obtenidos por Chew *et al.* (1997), quienes reportaron un aumento en la proliferación de linfocitos de cerdo, estimulados *in vitro* con Pokeweed, concanavalina A (Con A), fitohemaglutinina (PHA) y suplementados *in vitro* con CLA y β -caroteno. Sin embargo, a diferencia de Sugano *et al.*

(1999), el CLA por sí solo, inhibió la producción de IL-2 en los linfocitos y la actividad fagocítica de los macrófagos. Cuando el CLA y el β -caroteno se administraron juntos, la proliferación espontánea y la actividad citotóxica de los linfocitos se incrementó. Esta proliferación linfocitaria puede deberse a un aumento en cualquiera de los dos subtipos (T o B) y hay evidencias que sugieren que se debe a una mayor proliferación de los linfocitos T CD8⁺ (Bassaganya-Riera *et al.*, 2003).

Se han realizado pocos estudios en ratas y en cerdos para evaluar el papel que tiene el CLA en la producción de las poblaciones de linfocitos B y T. Uno de éstos es el de Sugano *et al.* (1998), en ratas. En éste se observó que al suplementar con 1% de CLA durante 3 semanas, los niveles de IgA, IgG e IgM incrementaron en el bazo, mientras que la IgE disminuyó. Así mismo, se observó una disminución en la PGE₂ y en los leucotrienos. Los mismos resultados fueron observados por Corino *et al.* (2001), en lechones, a los que suplementaron con 0.5 o 1.0% de CLA durante 28 días. Ellos también evaluaron el efecto del CLA sobre la lisozima (enzima que lisa las paredes de las bacterias Gram positivas), la cual fue incrementada. Estos resultados sugieren un mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares, además la disminución de IgE podría indicar que el CLA puede tener efectos anti-alérgicos (O'shea *et al.*, 2004).

Resultados similares a los de Sugano *et al.* (1998) y Corino *et al.* (2001), fueron observados en linfocitos de ratas suplementados *in vitro* con 1% de 9*c,11i* y 1% de 10*c,12i*-CLA por separado. En este experimento, se extrajeron los linfocitos del bazo de las ratas y se mostró que el isómero 10*c,12i* produjo mayor concentración de IgA e IgM pero no IgG. En contraste el isómero 9*c,11i* no afectó la producción de las inmunoglobulinas, pero aumentó la producción de TNF- α . Además, no se observaron diferencias entre los isómeros y el control

en la producción de IL-2, 4 y 5 y de INF- γ (Yamasaki *et al.*, 2003). Estos estudios sugieren que CLA regula la producción de inmunoglobulinas y que el isómero 10*c*, 12*t*-CLA podría ser el más activo en esta regulación.

La respuesta inmune adquirida está regulada por citocinas tipo Th1 y Th2. El INF- γ y la IL-2, son citocinas tipo Th1, la primera tiene como principal función activar macrófagos, y la segunda funciona activando la proliferación de células T. La IL-4, IL-5 e IL-10 son citocinas tipo Th2. La primera de éstas funciona como inductora de diferenciación de células T a Th2, estimula la producción de IgE y suprime a los macrófagos dependiente de INF- γ . La IL-5 estimula la diferenciación de eosinófilos y activa a los eosinófilos maduros, estas células están involucradas en las respuestas alérgicas. La IL-10 inhibe a los macrófagos activados manteniendo el control de los procesos inflamatorios. Otra citocina que está involucrada en la regulación de Th1/Th2, es la IL-12. Ésta es producida por macrófagos y células dendríticas e induce la respuesta tipo Th1 (Abbas *et al.*, 2002).

El efecto del CLA en la producción de citocinas tipo Th1 y Th2 es controversial y son muy pocos los estudios que hay al respecto. Uno de éstos es el de Kelley *et al.* (2002), quienes reportaron disminución en la secreción de IL-4 en linfocitos de bazo de ratones C57BL/6N suplementados *in vivo* con CLA. Por otra parte, Luongo *et al.* (2003), observaron que en células T de leucemia humana suplementadas *in vitro* con CLA y estimuladas con ésteres de forbol miristato (PMA), hubo un incremento en la expresión de IL-2 y de INF- γ . Debido a que la producción de IL-2 es inhibida por las PGE₂, y que el CLA disminuye la producción de éstas se puede esperar un aumento en la producción de IL-2. Esta citocina, al igual que el INF- γ es del tipo Th1, lo que sugiere un aumento de los linfocitos Th1.

Por otra parte, la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ es de vital importancia en el cerdo, debido a que los virus son los microorganismos que más los infectan. En este sentido, Bassaganya-Riera *et al.* (2001), suplementaron lechones con 2.21 g CLA/100g de peso durante 72 días, y observaron un aumento en el número de linfocitos CD8⁺. Bassaganya-Riera *et al.* (2000), también reportaron un incremento en la proliferación de linfocitos y en el número de CD8⁺ en lechones destetados a los 14 días de nacidos y suplementados con 2% de CLA-60 (30% del isómero 10*c*,12*i* y 30% 9*c*,11*i*). Otro estudio realizado por Bassaganya-Riera *et al.* (2003), mostró resultados muy similares cuando se infectó a cerdos con el circovirus porcino tipo 2. Estas evidencias sugieren que la actividad anti-viral ejercida por los linfocitos T CD8⁺ podría estar favorecida con la suplementación de CLA. Por lo tanto, incrementar la respuesta inmune frente a virus, se correlaciona con un aumento en el crecimiento y la eficiencia alimentaria del animal.

Otro estudio realizado, encaminado a evaluar la proliferación de linfocitos T CD8⁺, fue el de Lai *et al.* (2005a), quienes suplementaron a cerdos con 0, 1, 2 y 3 % de CLA durante 28 días, desafiándolos con ovoalbumina. Ellos observaron un aumento en la producción de linfocitos T CD8⁺ y disminución en la proporción LT. Además encontraron una disminución en las PGE₂ y en la IL-1β. En base a estos resultados y a estudios previos, ellos sugieren la posibilidad de que estén involucrados dos mecanismos de regulación. Uno de éstos es a través de PGE₂, que podría relacionarse con la producción de linfocitos. El otro, también sugerido por Yu *et al.* (2002), es a través de PPAR-γ, que podría regular la producción de IL-1β.

2.3. Mecanismos bioquímicos de regulación del sistema inmune mediados por el CLA

Existen dos posibles mecanismos que pudieran explicar el efecto del CLA en el sistema inmune. Uno de ellos es mediado a través de la síntesis de eicosanoides, debido a que se ha observado disminución en la síntesis de PGE₂ en ratas y cerdos suplementados con CLA. Además, se sabe que las PGE₂ inhiben la producción de citocinas Th1 y por ende inducen la respuesta Th2, probablemente a través del camino del AMPc como segundo mensajero. Por tanto, una disminución de las PGE₂ por efecto del CLA podría implicar una tendencia hacia la respuesta Th1. Sin embargo, no todos los efectos del CLA en el sistema inmune se pueden explicar mediante este mecanismo. Por eso se propone un mecanismo alternativo dependiente del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés). El CLA es activador y ligando de muy alta afinidad para el PPAR y se ha visto un aumento en la expresión de este receptor en cerdos suplementados con CLA. Este receptor está involucrado en procesos inflamatorios y en el sistema inmune. (Moya-Camarena *et al.*, 1999; Moya-Camarena y Belury, 1999; Belury *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2005b; Harris *et al.*, 2002).

2.3.1 Modulación del sistema inmune dependiente de eicosanoides

Los eicosanoides se derivan del ácido linoleico, el cual se incorpora en los fosfolípidos de la membrana celular para ser modificado por una desaturasa y elongado por una enzima que lo convierte a ácido araquidónico (AA). Bajo la acción de numerosos estímulos (tales como endotoxina, citocinas y hormonas, entre otros) la enzima fosfolipasa A₂, libera al ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular. El ácido araquidónico liberado es convertido, dependiendo del tipo celular, a prostaglandinas (PGs) (vía

ciclooxigenasa) o leucotrienos (vía lipooxigenasa) (Cook, 2002; Mathews y Van Holde, 2001; Nettleton, 1995; Wahle *et al.*, 2004).

El CLA y el ácido linoleico compiten por el mismo sistema enzimático ($\Delta 6$ desaturasa y elongasa), a través del cual modulan la acumulación del ácido araquidónico en los fosfolípidos. Cuando el CLA predomina sobre el ácido linoleico, este se une a la membrana convertido en ácido araquidónico conjugado, el cual por acción de la fosfolipasa A_2 , es desprendido de la membrana y convertido en araquidonato conjugado, este no es sustrato para las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa y por tanto, el resultado de este evento es una reducción en la producción de PGE_2 y de leucotrienos. Cuando el que predomina es el ácido linoleico, éste se convierte en ácido araquidónico, que por medio de la fosfolipasa A_2 es convertido en araquidonato, sustrato para la lipooxigenasa y ciclooxigenasa y por ende, hay producción de PGE_2 y leucotrienos (Figura 1). En este sentido, Yu *et al.* (2002), han estudiado el efecto del CLA sobre la expresión de productos pro-inflamatorios de macrófagos murinos RAW 264.7. Sus resultados muestran que el CLA disminuye los mediadores de inflamación ciclooxigenasa 2, óxido nítrico sintetasa y $TNF-\alpha$ a nivel de RNAm. Este mecanismo no ha sido completamente esclarecido, pero se sugiere que el CLA puede disminuir la producción de $TNF-\alpha$, posiblemente a través de la regulación de los eicosanoides, debido a que las PGE_2 inhiben la producción de $TNF-\alpha$, así como las citocinas pro-inflamatorias (Pariza *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2002).

Por otro lado, la modulación de las citocinas Th1/Th2 por medio de las PGE_2 se puede explicar en parte, debido a que éstas al ser producidas se unen a su receptor en la membrana de la célula. Esta unión da por resultado la estimulación de la adenilato ciclasa, incrementando la activación de la adenina monofosfato cíclica. Este incremento parece ser el responsable de que se

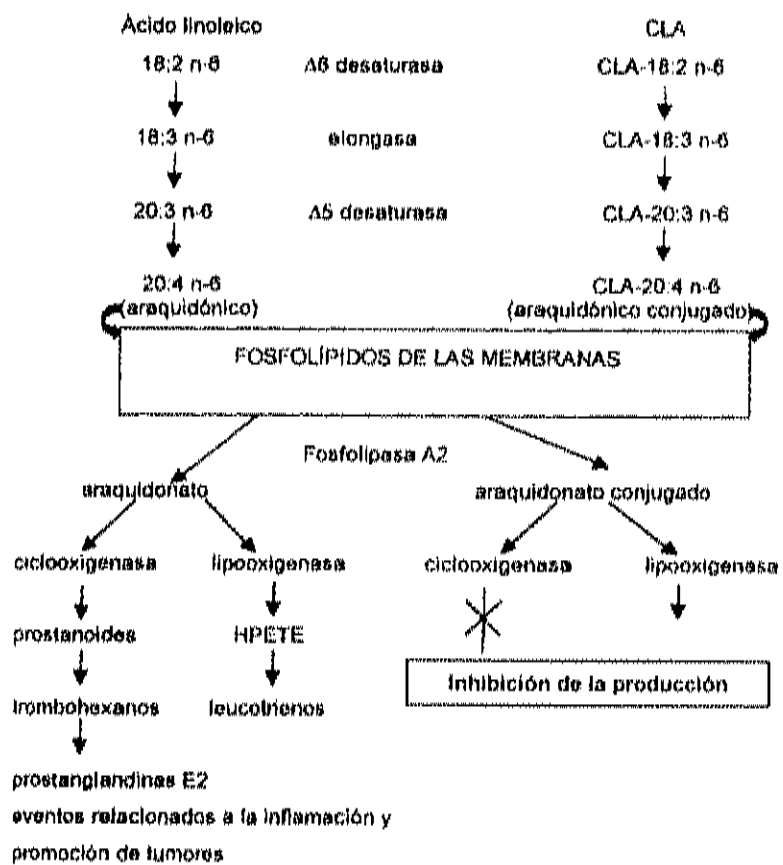


Figura 1. EL CLA compite con el ácido linoleico en la síntesis de eicosanoides (Castellanos, 2002).

inhiba la IL-12, IL-2 e INF- γ . La IL-12 induce la respuesta tipo Th1 por lo que se sugiere que la inhibición de las PGE₂, por acción del CLA, podría aumentar la respuesta tipo Th1. Además las citocinas IL-2 e INF- γ son del tipo Th1 y se ha observado que en roedores, el CLA aumenta la producción de tales citocinas. (Kolenko *et al.*, 1999; Van der Pouw Kraan *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 2002; Hotencillas *et al.*, 2002; Luongo *et al.*, 2003).

2.3.2. Modulación del sistema inmune dependiente de PPAR

Los PPARs son factores de transcripción nucleares que pertenecen a la superfamilia de los receptores de las hormonas esteroideas/tiroideas/ácido retinóico. Se encuentran formando heterodímeros con el receptor de ácido retinóico (RXR). Junto a éste, reconocen secuencias específicas en los genes regulados llamadas elementos de respuestas para los proliferadores de peroxisomas (PPRE, por sus siglas en inglés). El PPAR se activa cuando se une el ligando, que puede ser fármacos, leucotrienos, prostaglandinas y ácidos grasos poli-insaturados como el CLA. Cuando esto ocurre puede inducirse el inicio de la transcripción, regulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, metabolismo de la glucosa, diferenciación de adipocitos, cáncer, reacciones inflamatorias y función inmune (Yu *et al.*, 2002; Kersten *et al.*, 2000; Houseknecht *et al.*, 2001; Delerive *et al.*, 2001).

El CLA es ligando para los tres subtipos de PPAR, uniéndose con mayor afinidad al subtipo α , el cual está relacionado con el metabolismo de lípidos. El PPAR- β está relacionado con la regulación de los subtipos α y γ . El PPAR- γ participa en la diferenciación de adipocitos y se le ha relacionado con la función inmune (Moya-Camarena *et al.*, 1999; Moya-Camarena y Belury, 1999).

Para estudiar el efecto del PPAR en la respuesta inmune, Hontencillas *et al.* (2002), realizaron un estudio en el que indujeron colitis a través de la bacteria *Brachyspira hyodysenteriae* en cerdos suplementados con 1.33 g CLA/100 g de dieta por 72 días. Ellos reportaron que hubo un aumento en la expresión de PPAR- γ en los nódulos linfáticos, un aumento de linfocitos CD8⁺ y una disminución de linfocitos CD4⁺. Por ello, se sugiere que el PPAR- γ puede regular la linfogénesis en la médula ósea y de esta manera incrementar la producción de linfocitos CD8⁺ e inhibir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ (Bassaganya-Riera *et al.*, 2000). También se ha observado que el PPAR aumenta la expresión del factor de transcripción T-bet, el cual induce la diferenciación de los linfocitos Th1. Sin embargo, hay evidencias que suponen que el PPAR- γ interactúa con el factor de transcripción nuclear de células T activadas (NFAT), mediante la inhibición de la producción de IL-2. Además se ha observado que el PPAR aumenta la expresión de INF- γ a nivel transcripcional, por lo que es probable que disminuyan los linfocitos Th1 activados (Jones *et al.*, 2002; Delerive *et al.*, 2001).

El aumento en la expresión de PPAR- γ , se correlaciona con la disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias (Lai *et al.*, 2005). Esta disminución podría deberse a que el PPAR antagoniza con los factores de transcripción NF- $\kappa\beta$ y AP-1 suprimiendo la transcripción de estas citocinas (Jones *et al.*, 2002). Existen evidencias de la participación del PPAR en la modulación de la respuesta inmune, sin embargo, los mecanismos de tal regulación no se han esclarecido por completo.

3. JUSTIFICACIÓN

Hay evidencias que sugieren que el CLA aumenta la producción de linfocitos T CD8+, modula la producción de inmunoglobulinas y regula la expresión de ciertas citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre la producción de citocinas del tipo Th1 y Th2. Los estudios reportados a la fecha, muestran inconsistencias en cuanto a esta respuesta. Aunque, se ha observado que la suplementación *in vitro* con CLA, aumenta la producción de INF- γ e IL-2 (Luongo *et al.*, 2003; Hotencillas *et al.*, 2002), las cuales son citocinas tipo Th1. Sin embargo, existen estudios que difieren de éstos ya que reportan disminución en la IL-2 (Chew *et al.*, 1997). Por otro lado, hay reportes que sugieren que el uso del CLA como suplemento en el alimento de ratones, provoca disminución en la producción de IL-4 (Kelley *et al.*, 2002), citocina tipo Th2. También, se ha discutido que dependiendo de la especie animal, del isómero o bien, de la mezcla de CLA puede montarse una respuesta diferente y particularmente los estudios en cerdos son escasos.

El conocimiento de las propiedades inmunomoduladoras del CLA permitiría su uso en el control y prevención de enfermedades virales o bacterianas que afectan al cerdo. De esta manera, se mejoraría la ganancia de peso y la conversión del alimento, factores importantes en la producción porcina.

4. HIPOTESIS

El CLA modula la respuesta tipo Th1/Th2 en cerdos.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto *in vitro* del CLA en células mononucleares (CMN) de cerdo sobre la modulación de la respuesta Th1/Th2.

5.2 Particulares

- Evaluar la producción de citocinas tipo Th1 (INF γ e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en CMN estimuladas con fitohemaglutinina (PHA) y suplementadas con isómeros individuales de CLA (9*c*,11*i* y 10*i*,12*c*-CLA) y una mezcla 1:1 de éstos.
- Analizar por RT-PCR en tiempo real los transcritos de las citocinas tipo Th1 (INF- γ e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en CMN estimuladas con PHA y suplementadas con isómeros individuales de CLA (9*c*,11*i* y 10*i*,12*c*-CLA) y una mezcla 1:1 de éstos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 8 lechones sanos de 21 días de edad provenientes de una granja de Hermosillo, Sonora, libres de las principales enfermedades de los cerdos. Los animales fueron alojados en la Unidad Metabólica Animal de CIAD, con alimento y agua *ad libitum*. El alimento fue formulado de acuerdo a las recomendaciones del Consejo Nacional de Investigación (1998) (NRC, por sus siglas en inglés).

6.2 Cultivo celular y suplementación

Se extrajo sangre periférica de 8 cerdos en tubos con heparina, para obtener las CMN a partir de gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech). Las CMN se contaron en cámara de Neubauer, utilizando azul tripano (Sigma) como colorante de exclusión, y se ajustaron a 5×10^5 células. Las CMN se cultivaron en placas estériles de 96 pozos (Corning Incorporated Costar), y se suplementaron con 0, 10 ó 100 μM de los isómeros *9c,11l*-CLA, *10c,12l*-CLA (MATREYA) y una mezcla 1:1 de los mismos. La producción de citocinas se estimuló con PHA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma), y se incubaron durante 24 h a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO_2 . Las células se mantuvieron en un volumen final de 200 μL de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 2×10^{-5} M 2-mercaptoetanol (Sigma), 2 mM piruvato de sodio (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Sigma G-1272) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco).

6.3 Detección de las citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 por citometría de flujo

Las CMN suplementadas con CLA y estimuladas con PHA se cosecharon a las 24 h. Las CMN fueron incubadas con brefeldina A (BFA) (0.25 mg/mL) (Sigma), 4 h antes de ser cosechadas en tubos de poliestireno (Falcon) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 1% durante 20 min. Se lavaron con una solución amortiguadora de PBA [buffer salino de fosfatos (PBS), pH 7.2; buffer de albúmina de suero bovino (BSA), 0.2%]. Después, se permeabilizaron con saponina (Sigma) al 0.1% durante 20 min. Se realizó un lavado con saponina al 0.05% y se adicionó el anticuerpo monoclonal diluido correspondiente [anti-p IL2 (1:200), anti-p IL4 (1:150) anti-p IL10 (1:100) y anti-p INF- γ (1:20)], se incubaron por 30 min en oscuridad y a 4°C. Posteriormente se lavaron con saponina al 0.05% y finalmente se agregó el segundo anticuerpo monoclonal diluido dirigido contra el primero, éste estaba marcado con ficoeritrina (PE) (Goat anti-mouse Ig (H+L)-RPE, dilución 1:400). Las células se lavaron con PBA y se fijaron con PFA al 1% y se almacenaron a 4°C para ser adquiridas en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), a través del software CELLQUEST. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los descritos por Sipos *et al.* (2004) (BD Biosciences Pharmingen). Los resultados arrojados por el citómetro de flujo se analizaron mediante el software WinMDI 2.8.

6.4 Extracción del RNA total

Se utilizaron CMN de 4 de los 8 cerdos mencionados anteriormente. Se incubaron 2.5×10^6 de estas células con la mezcla de CLA 100 μ M y PHA durante 24 h en placas de 24 pozos (Corning Incorporated Costar). Las células se mantuvieron en 1 mL de RPMI-1640 suplementado con antibióticos y con

10% SFB. Posteriormente las células se cosecharon y se pasaron a microtubos de 1.7 mL (Rainin), se centrifugaron durante 4 min a 4000 rpm a 4°C (Centrifuga Beckman GS-15R). Al pellet se agregó 1 mL de TRIZOL (Gibco BRL) y se siguieron las especificaciones del proveedor. El RNA total se resuspendió en 20 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se analizó su concentración y pureza en un espectrofotómetro (Beckman DU 530) a 260 nm y la relación 260/280 nm, respectivamente. Por último, el RNA total se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.5 Síntesis de DNA complementario (DNAc)

Para realizar la transcripción reversa se utilizó el kit SuperScript™ (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las especificaciones del proveedor con algunas modificaciones. Se utilizaron 5 µg de RNA total, 0.5 mM de una mezcla de trifosfato deoxinucleótidos y 1 µL del oligo DT. La reacción fue llevada a un volumen de 10 µL con agua tratada con DEPC y se incubó a 65°C por 5 min para la desnaturalización. A la mezcla anterior se le agregaron los siguiente componentes: buffer RT 10X [20 mM Tris HCL (pH 8.4), 50 mM KCl], 5 mM de MgCl₂, 0.01 M de DTT (Dithiotheitol) y 2 U de inhibidor RNase OUT™. La mezcla se incubó a 42°C por 2 min. Posteriormente, se le agregó 2.5 U de la enzima SuperScript™ II RT en un volumen final de 20 µL. Cada mezcla se incubó a 42°C por 50 min y para terminar la reacción se incubaron a 70°C por 15 min, y se mantuvieron en hielo. Se agregó 1 µL de RNase H (2 U/µL) y se incubó por 20 min a 37°C para eliminar el RNA. El DNAc fue almacenado a menos 20°C hasta su uso.

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

La cuantificación del RNAm de las citocinas Th1/Th2 se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit Brilliant QPCR Core Reagent (Stratagene), utilizando el sistema detector de secuencias Smartcycler (Cepheid Technical Support). Se utilizó el gen constitutivo isomerasa de peptidilprolil A (PPIA₂ por sus siglas en inglés) para obtener una cuantificación relativa de los transcritos de las citocinas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Las temperaturas de alineación fueron de 60°C. Los iniciadores y sondas que se utilizaron fueron los descritos por Dawson *et al* (2005), cuyas secuencias y números de acceso en el GenBank aparecen en la Tabla 1. Para realizar los cálculos del nivel de expresión de los diferentes genes, se utilizó la Ct (ciclo umbral) proporcionada por el programa provisto en el detector de secuencias Smartcycler, a partir de ésta se calculó la eficiencia de PCR por medio del programa LinRegPCR, para linealizar los datos y posteriormente calcular el incremento relativo respecto a la expresión del gen constitutivo PPIA₂ y respecto tratamiento sin CLA.

Tabla 1. Secuencias de iniciadores y sondas.

| Iniciador | Secuencia del iniciador (5'-3') | Secuencia de la sonda (5'-3') | No. de acceso |
|------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------|
| INF-γ (S) | TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG | 6FAM-CTTCGAAAAGCTGATTAAAAATCCGGTAG | X53085 |
| INF-γ (AS) | GGCTTTGGCGCTGGATCTG | ATAATCTGC-TAMRA | |
| IL-2 (S) | ACAGTTGCTTTTGAAGGAAGTTAAGAA | 6FAM-CGAGAATGCTGATCTCTCAGGATGCTC- | X56750 |
| IL-2 (AS) | CCTGCTTGGGCATGTAAAATTT | TAMRA | |
| IL-4 (S) | GCCGGGCCCTCGACTGT | 6FAM-CTTCGGCACATCTACAGACACCACACG- | X68330 |
| IL-4 (AS) | TCCGCTCAGGAGGCTCTTC | TAMRA | |
| IL10 (S) | TGAGAACAGCTGCATCCACTTC | | |
| IL10 (AS) | TCTGGTCCTTCGTTTGAAGAAA | 6FMA-CAACCAGCCTGCCCCACATGC-TAMRA | L20001 |

6.7 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos de los tratamientos. Las diferencias significativas entre las medias fueron determinadas a través de la prueba de Duncan con un 95% de confianza. Se usó el paquete estadístico NCSS-97.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Producción de citocinas tipo Th1/Th2 por CMN suplementadas con CLA y estimuladas con PHA.

Se realizó la determinación de las citocinas INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en CMN de ocho cerdos, suplementadas con los isómeros *9-cis,11-trans* y *10c,12l* CLA y la mezcla 1:1 de éstos, y estimulados con PHA. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos para la producción de INF- γ , observándose que en las células estimuladas con PHA, hay un aumento significativo en la producción de esta citocina, resultado de la activación celular. Respecto al efecto de los isómeros del CLA y su mezcla en la producción de INF- γ , aunque no hay un efecto significativo ($p > 0.05$), se puede observar que el isómero *10-trans, 12cis* y la mezcla en su concentración mas alta (100 μ M) muestran una tendencia a disminuir la producción de INF- γ , lo que concuerda con los reportes en los que han encontrado respuestas isómero específica.

Además, Bassaganya-Riera *et al.* (2003), quienes suplementaron con 1.33 g de CLA por 100 g de dieta durante 63 días, a cerdos infectados con circovirus porcino tipo 2 (PCV2), observaron una disminución en la producción de INF- γ , medido a través de citometría de flujo, con respecto a la dieta control (1.33 g de aceite de soya por 100 g de dieta). Así mismo, en un estudio realizado por Hotencillas *et al.* (2002), reportaron que al infectar con *Brachyspira hyodysenteriae* (bacteria que induce colitis en el cerdo) a cerdos suplementados con 2.21 g CLA por 100 g de dieta durante 72 días, hay una atenuación de INF- γ a nivel de RNAm. Sin embargo, en estudios realizados en humanos se ha observado que el CLA no produce cambios en esta citocina (Kelley *et al.*, 2001; Albers *et al.*, 2003), lo que sugiere un efecto especie-

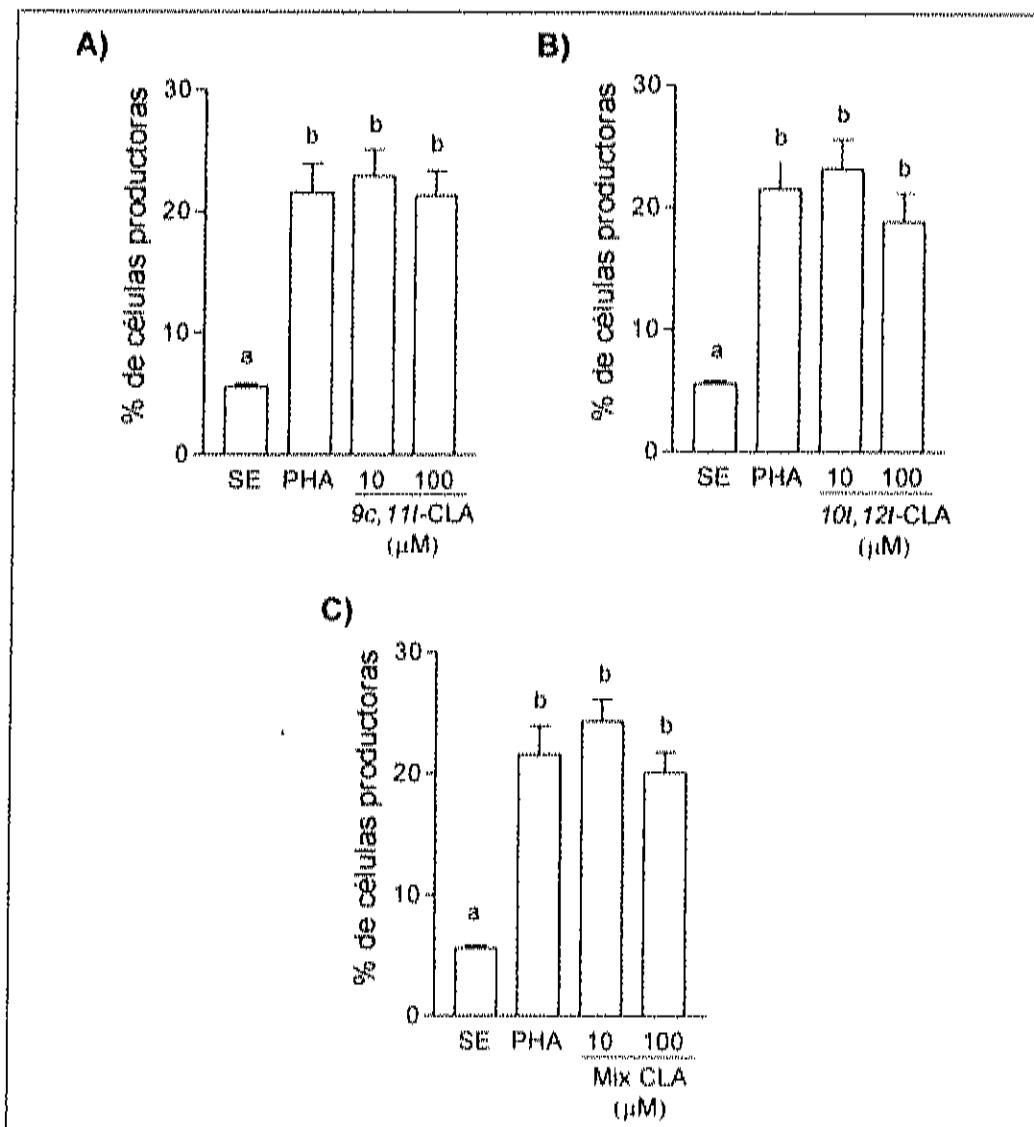


Figura 2. Porcentaje de CMN productoras de INF- γ estimuladas con PHA (10 μ M) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos (n = 8). **A)** Porcentaje de CMN productoras de INF- γ suplementadas con el isómero 9*c*,11*i*-CLA (10 y 100 μ M). **B)** Porcentaje de CMN productoras de INF- γ suplementadas con el isómero 10*i*,12*i*-CLA (10 y 100 μ M). **C)** Porcentaje de CMN productoras de INF- γ suplementadas con una mezcla 1:1 de isómeros de CLA (10 y 100 μ M). SE: Sin estímulo, PHA: Fitohemaglutinina. Mix: Mezcla. Letras diferentes representan diferencias significativas (p<0.05).

especifico (Moya-Camarena y Belury, 1999).

Respecto a la producción de IL-2, no se observa efecto significativo ($p > 0.05$) en ninguno de los tratamientos con CLA (Figura 3), pero se observa una tendencia a aumentar cuando se suplementa con la concentración mas baja (10 μM) del isómero *10t,12c* y de la mezcla. En un estudio realizado en esplenocitos de ratones C57BL/6N suplementados *in vitro* durante 56 días con 5 g/kg de los isómeros *9c,11t* y *10t,12c*-CLA y estimulados con concanavalina A (ConA), tampoco se reporta un efecto para la IL-2 (Kelley *et al.*, 2002). Así mismo, Yamasaki *et al.* (2003), quienes suplementaron a ratones C57BL/6J, durante 3 semanas, con los isómeros *9c,11t* y *10t,12c*-CLA, en una concentración de 5 g/kg de peso, tampoco observaron un efecto en la producción de esta citocina. Además, existen reportes de estudios realizados en humanos en los que no se muestra un efecto por parte del CLA en la producción de IL-2 (Albers *et al.*, 2003; Kelley *et al.*, 2001). Sin embargo, en un estudio realizado por Chew *et al.* (1997), en linfocitos de cerdo, suplementados *in vitro* con CLA en distintas concentraciones (0, 1.78, 3.57 y 7.14 mM), encontraron que el CLA inhibía la producción de IL-2, por lo que podría creerse que el CLA a concentraciones altas disminuye tal citocina. Por otro lado Yang y Cook (2003), reportaron un aumento en la IL-2 en esplenocitos de ratones BALB/c, suplementados *in vivo* con 0.5% CLA por 3 semanas y estimulados *ex vivo* con ConA durante 48 h.

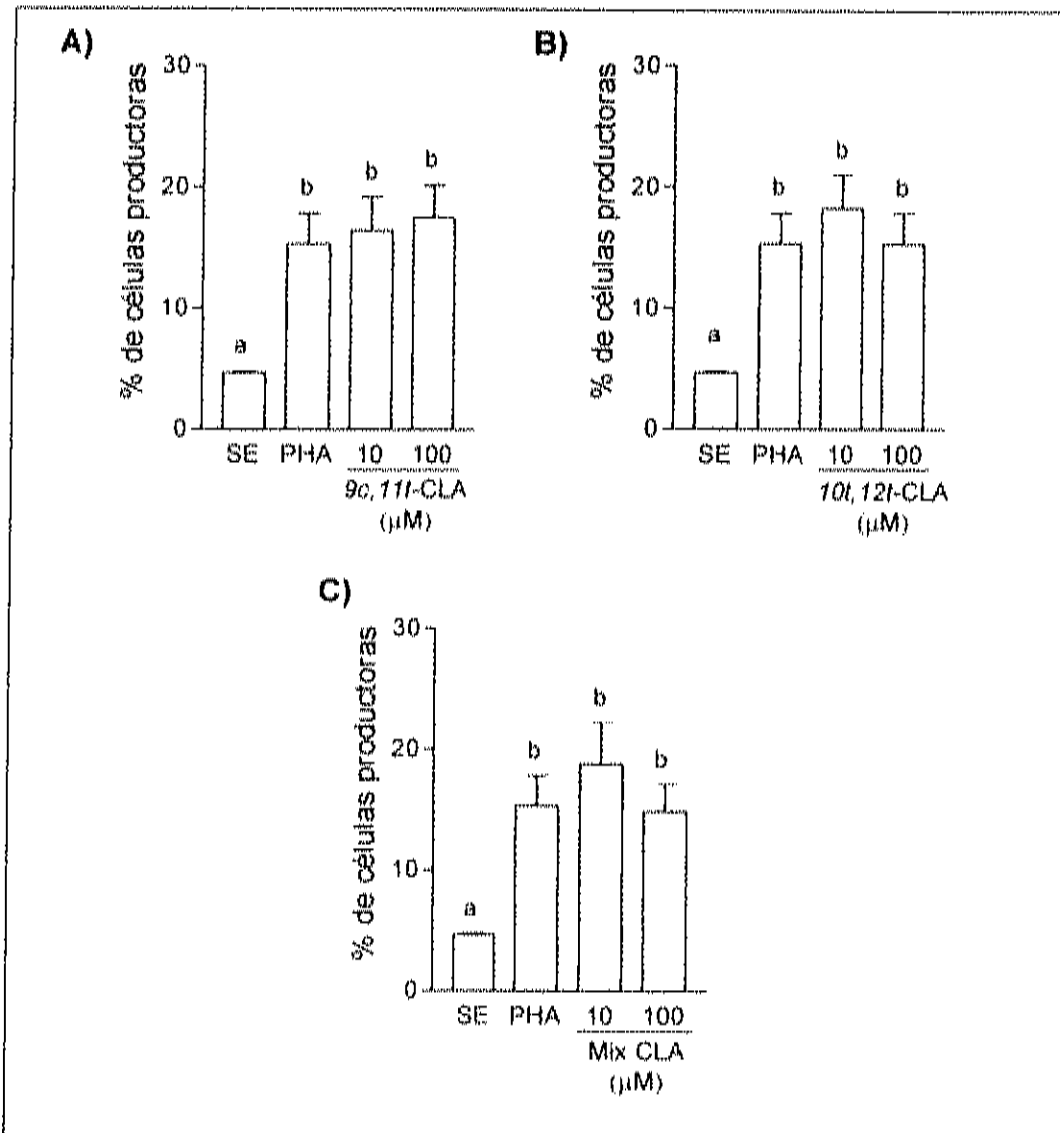


Figura 3. Porcentaje de CMN productoras de IL-2 estimuladas con PHA (10 μM) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos (n=8). **A)** Porcentaje de CMN productoras de IL-2 suplementadas con el isómero 9*c*, 11*i*-CLA (10 y 100 μM). **B)** Porcentaje de CMN productoras de IL-2 suplementadas con el isómero 10*t*, 12*i*-CLA (10 y 100 μM). **C)** Porcentaje de CMN productoras de IL-2 suplementadas con una mezcla 1:1 de isómeros de CLA (10 y 100 μM). SE: Sin estímulo, PHA: Fitohemaglutinina. Mix: Mezcla. Letras diferentes representan diferencias significativas (p<0.05).

Por otro lado, las determinaciones de interleucina 4 (IL-4) citocina tipo Th2, no muestran un efecto en ninguno de los tratamientos empleados ($p > 0.05$) (Figura 4). Este resultado no concuerda con lo reportado por Kelley *et al.* (2002), quienes trabajaron con esplenocitos de ratones C57BL/6N suplementados *in vivo* con 5 g/kg de 9*c*,11*i* y de 10*l*,12*c*-CLA por 56 días. Estos autores cultivaron los esplenocitos con ConA y LPS, durante 48 h y observaron que la concentración de IL-4 disminuía con los 2 isómeros y esta disminución era más marcada con el paso del tiempo (24 y 48 h). Yang y Cook (2003), también observaron disminución de IL-4 en esplenocitos de ratones BALB/c, suplementados *in vivo* con CLA y estimulados *ex vivo* con ConA durante 48 h. Sin embargo las condiciones experimentales, y los modelos animales usados por estos autores no fueron los mismos que en este trabajo. Además, en estudios realizados con ratones C57BL/6J y humanos no se han observado efectos (Yamasaki *et al.*, 2003; Albers *et al.*, 2003).

En cuanto a la producción de IL-10, citocina producida por linfocitos T y por macrófagos, no hubo un efecto significativo debido al tratamiento con CLA ($p > 0.05$), sin embargo, se puede observar que con el isómero 10*l*,12*c*-CLA y con la mezcla tiende a disminuir (Figura 5). En contraste a estos resultados, Lai *et al.* (2005b), reportaron que en cerdos suplementados durante 28 días con una mezcla comercial de CLA (CLA-80, 40% del isómero 9*c*,11*i* y 40% del 10*l*,12*c*-CLA), que en el día 14 fueron inyectados con lipopolisacárido (LPS), mostraron un aumento en la concentración plasmática de IL-10 así como en el RNAm extraído de bazo y timo. Loscher *et al.* (2005), reportaron que en células dendríticas obtenidas de ratones BALB/c y estimuladas con LPS, el CLA aumentó la producción de IL-10. Estas discrepancias sugieren que el CLA tiene efecto diferente dependiendo del estímulo empleado y del tipo de célula utilizada. Sin embargo los reportes en donde se ha evaluado la producción de

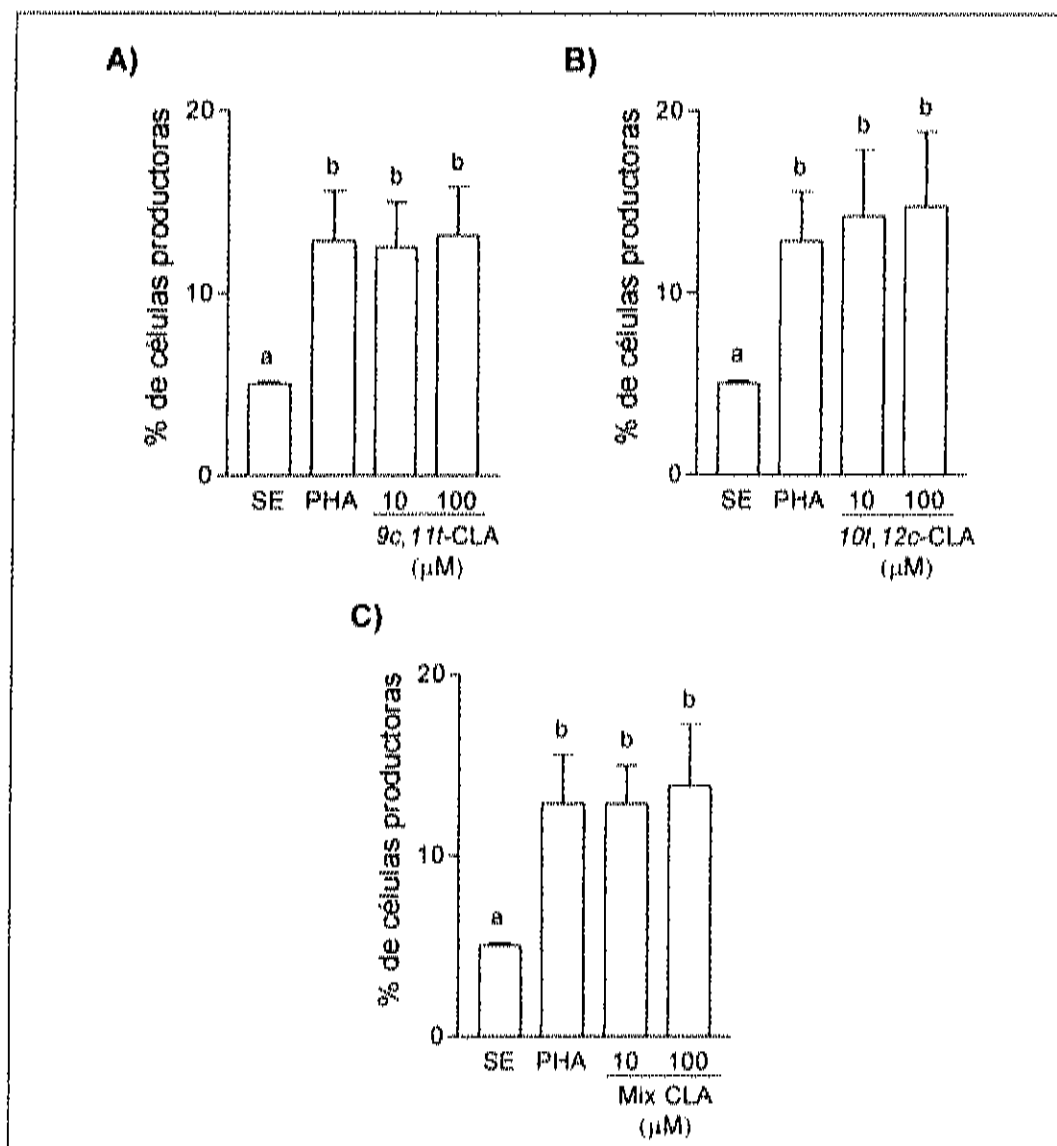


Figura 4. Porcentaje de CMN productoras de IL-4 estimuladas con PHA (10 μM) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos (n=8). **A)** Porcentaje de CMN productoras de IL-4 suplementadas con el isómero 9*c*, 11*i*-CLA (10 y 100 μM). **B)** Porcentaje de CMN productoras de IL-4 suplementadas con el isómero 10*i*, 12*c*-CLA (10 y 100 μM). **C)** Porcentaje de CMN productoras de IL-4 suplementadas con una mezcla 1:1 de isómeros de CLA (10 y 100 μM). SE: Sin estímulo, PHA: Fitohemaglutinina. Mix: Mezcla. Letras diferentes representan diferencias significativas (p<0.05).

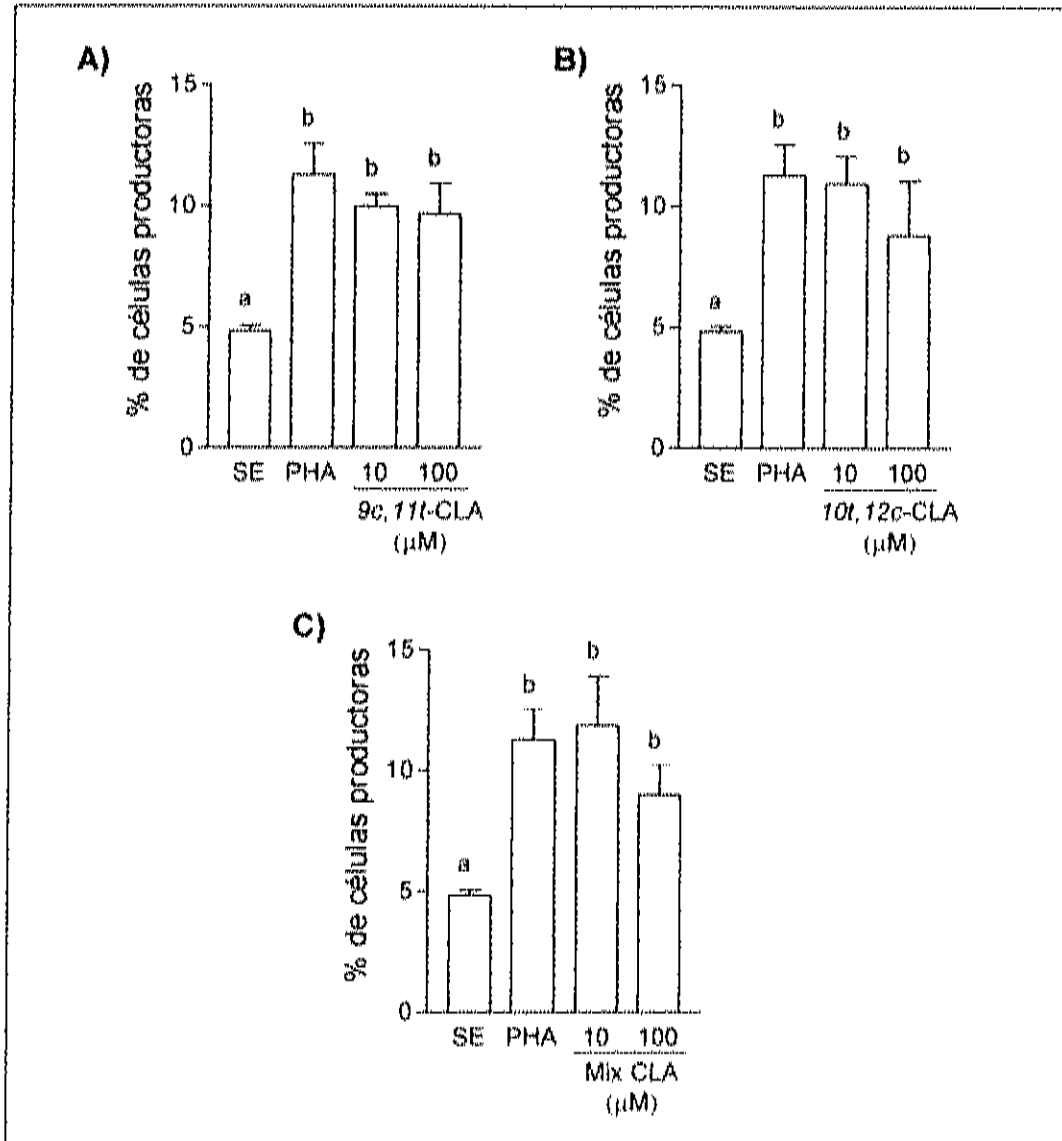


Figura 5. Porcentaje de CMN productoras de IL-10 estimuladas con PHA (10 μ M) y suplementadas con diferentes isómeros de CLA y una mezcla 1:1 de los mismos (n=8). **A)** Porcentaje de CMN productoras de IL-10 suplementadas con el isómero 9*c*, 11*t*-CLA (10 y 100 μ M). **B)** Porcentaje de CMN productoras de IL-10 suplementadas con el isómero 10*t*, 12*c*-CLA (10 y 100 μ M). **C)** Porcentaje de CMN productoras de IL-10 suplementadas con una mezcla 1:1 de isómeros de CLA (10 y 100 μ M). SE: Sin estímulo, PHA: Fitohemaglutinina. Mix: Mezcla. Letras diferentes representan diferencias significativas (p<0.05).

IL-10 además de ser escasos, se ha evaluado principalmente la expresión de RNAm, como se menciona en la sección 7.2.

Se puede observar que se tuvo una alta variabilidad en la respuesta a pesar de que el número de muestra analizada fue elegida de acuerdo a la revisión bibliográfica, en donde utiliza de 3 a 6 animales. Esta variabilidad puede ser un motivo de no observar efectos significativos. Además, se ha reportado que en cerdos, dependiendo de la edad, género y camada, puede haber una variación en las citocinas producidas por los linfocitos T (Groot *et al.*, 2005), pudiendo alguno de estos factores haber afectado en los resultados obtenidos en este trabajo.

Aunado a lo anterior, hay reportes que indican que el CLA puede tener un efecto diferente dependiendo de los isómeros que se utilicen, de la mezcla de los mismos y de la concentración empleada, siendo pocos los estudios que reportados en donde se utilicen los isómeros de manera individual (Lai *et al.*, 2005a; Yamasaki *et al.*, 2003). En este sentido se ha observado en inmunoglobulinas y en estudios de deposición de grasa, que el isómero 10*t*,12*c*-CLA es el que tiene mayor efecto (Yamasaki *et al.*, 2003; Hargrave *et al.*, 2002); mismo isómero que parece afectar los procesos inflamatorios disminuyendo la expresión de ciclooxigenasa en ratones BALB/c inyectados con LPS (Li *et al.*, 2005).

7.2 Expresión del RNAm de las citocinas tipo Th1/Th2 de CMN suplementadas con CLA y estimuladas con PHA.

Además de evaluar la producción de las citocinas INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 a nivel de proteína, también se evaluó la expresión del RNAm de las citocinas INF- γ , IL-2, IL-10, IL-12 y PPAR- γ , a través de la cuantificación relativa utilizando el gen constitutivo PPIA₂. Las CMN se estimularon con PHA y se suplementaron con la mezcla 1:1 de CLA 100 μ M (50% del isómero *9c,11t* y 50% del isómero *10c,12t*), incubándose durante 24 h, posteriormente se extrajo el RNA total para obtener el DNAc por medio de transcripción reversa y llevar a cabo las reacciones de amplificación por medio de PCR en tiempo real. EL CLA se usó como mezcla y en la concentración de 100 μ M en base a los resultados obtenidos en la cuantificación de las citocinas por citometría de flujo, ya que bajo estas condiciones se observó una tendencia más marcada en la producción de la proteína.

Para realizar los cálculos del nivel de expresión de RNAm de las diferentes citocinas se la Ct (ciclo umbral), a partir de la cual se calculó la eficiencia. Para posteriormente calcular el incremento relativo respecto a las CMN no suplementadas con CLA.

En la figura 6 se observan los resultados de PCR en tiempo real, en donde se evaluaron la IL-2 y el INF- γ , que representan la respuesta tipo Th1, la citocina IL-10, como parte de la respuesta Th2 y la IL-12 e PPAR- γ como reguladores. Se puede observar una tendencia hacia la respuesta Th2, debido a la disminución no significativa de la IL-2 e INF- γ (Th1) y la tendencia al aumento en la IL-10 (Th2).

Los transcritos de la IL-2 en CMN suplementadas con CLA se observa una tendencia a disminuir respecto a CMN que carecían de este suplemento ($p>0.05$) (Figura 6). Esto concuerda con lo reportado por Quintana (2006), quien suplementó con las mismas concentraciones de CLA empleadas en este trabajo y estimuló con ConA, observando una tendencia a disminuir la proliferación celular, que se correlaciona con una disminución en la expresión de RNAm de IL-2. En contraste a estos resultados existe un estudio realizado por Bassagania-Riera *et al.* (2003), en el que infectaron a cerdos con PCV2 y los suplementaron con 1.33 gCLA/100g de dieta. Ellos reportaron que los cerdos infectados no suplementados suprimían la expresión de RNAm de IL-2 en timo, mientras que los que fueron alimentados con CLA incrementaban el RNAm de IL-2. Esta citocina promueve la proliferación celular, efecto que también fue reportado por estos autores, estas diferencias pueden deberse que las condiciones experimentales no fueron las mismas.

Por otro lado para el INF- γ hubo una tendencia a disminuir cuando se suplementaba con CLA ($p>0.05$) (Figura 6). De manera que se puede hablar de una tendencia hacia la respuesta Th2. Este resultado concuerda con lo reportado por Hotencillas *et al.* (2002), en cerdos a los que se les indujo colitis, ellos evaluaron la expresión de RNAm de nódulos linfáticos y observaron una disminución en el INF- γ y de IL-10.

También se evaluó la expresión de IL-10, citocina representativa de los linfocitos Th2, la expresión de RNAm se vio aumentada por el CLA aunque sin ser ésta significativa ($p>0.05$) (Figura 6). Este resultado concuerda con lo reportado por Lai *et al.* (2005b), en cerdos suplementados durante 28 días con una mezcla comercial de CLA, que fueron desafiados con LPS. Además en células dendríticas de ratones BALB/c suplementados con CLA también se observó un aumento en la producción de la IL-10 a nivel de proteína (Loscher *et*

al. 2005). Opuesto a estos resultados Hotencillas *et al.*, (2002) reportaron que en cerdos infectados con *Brachyspira hyodysenteriae* que habían sido suplementados con CLA, una disminución de la IL-10 a nivel de RNAm extraído de nódulos linfáticos. Por otro lado, el hecho de que los transcritos de esta citocina se incrementen sugiere que el CLA brinda un efecto anti-inflamatorio. Sin embargo, en la producción de proteína evaluada por citometría de flujo, se observa una tendencia a disminuir, lo que podría deberse a que posiblemente la cantidad de proteína detectada no fue el total de la proteína producida o, parte de ésta, no alcanzó a ser secretada por la célula.

Cabe mencionar que cuando se emplean citometría de flujo y tiempo real para medir proteína y RNAm respectivamente, se pueden obtener resultados diferentes; esto debido a que puede ser que la proteína que se mide no es el total que se encuentra expresado en forma de RNAm.

Otra citocina que fue evaluada a nivel de RNAm es la IL-12, esta es producida por macrófagos y células dendríticas principalmente y es un fuerte inductor de la respuesta Th1. De manera que una disminución de IL-12 se correlaciona con una tendencia de la respuesta hacia la producción de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10). Además esta citocina, es fuertemente inhibida por las PGE₂, que éstas a su vez, se han reportado que son inhibidas por el CLA. En este trabajo se observó una disminución del RNAm de la IL-12 en CMN suplementadas con CLA ($p > 0.05$) (Figura 6), por lo que se sugiere que puede haber una polarización hacia la respuesta Th2, lo que concuerda a su vez con el aumento de los transcritos de IL-10 ($p > 0.05$) (Figura 6). Resultados similares fueron observados por Locsher *et al.* (2005) en células dendríticas de ratones BALB/c desafiadas con LPS, además ellos discuten que estos efectos depende de la inhibición de la activación del NF- κ B, factor que está relacionado con el receptor PPAR por antagonizar con él.

Respecto a la expresión de PPAR- γ , en este trabajo se encontró aumentada en células suplementadas con CLA (Figura 6), resultado que se debe a que este ácido graso poli-insaturado es ligando para el PPAR, por lo que se aumenta su expresión e induce su activación. Esto concuerda con diferentes estudios en donde se ha discutido que al activarse este receptor nuclear se inhiben y activan genes relacionados con el metabolismo de lípidos, eventos cancerosos, acción de la insulina y procesos inflamatorios e inmunológicos. En estos últimos no se conoce exactamente el mecanismo de acción, aunque se ha propuesto al CLA como uso terapéutico en enfermedades inflamatorias, ya que se ha visto que ligandos del PPAR- γ son capaces de estimular la diferenciación de monocitos a macrófagos e inhibir la inducción de óxido nítrico sintetasa inducible y las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8. Además se sabe que el PPAR- γ antagoniza con los factores de transcripción NF- κ β y AP-1, los cuales están relacionados con la producción de citocinas pro-inflamatorias y citocinas producidas por linfocitos T (Belury *et al.* 2002; Meadus *et al.* 2002; Houseknecht *et al.* 2002; Delerive *et al.* 2001; Lai *et al.* 2004). Por otro lado, Jones *et al.* (2002), reportó que el PPAR subtipo α controla el inicio de la transcripción de T-box expresado en células T (T-bet), cuya activación regula la producción de IL-2, suprimiéndola, y la producción de INF- γ , estimulando su síntesis.

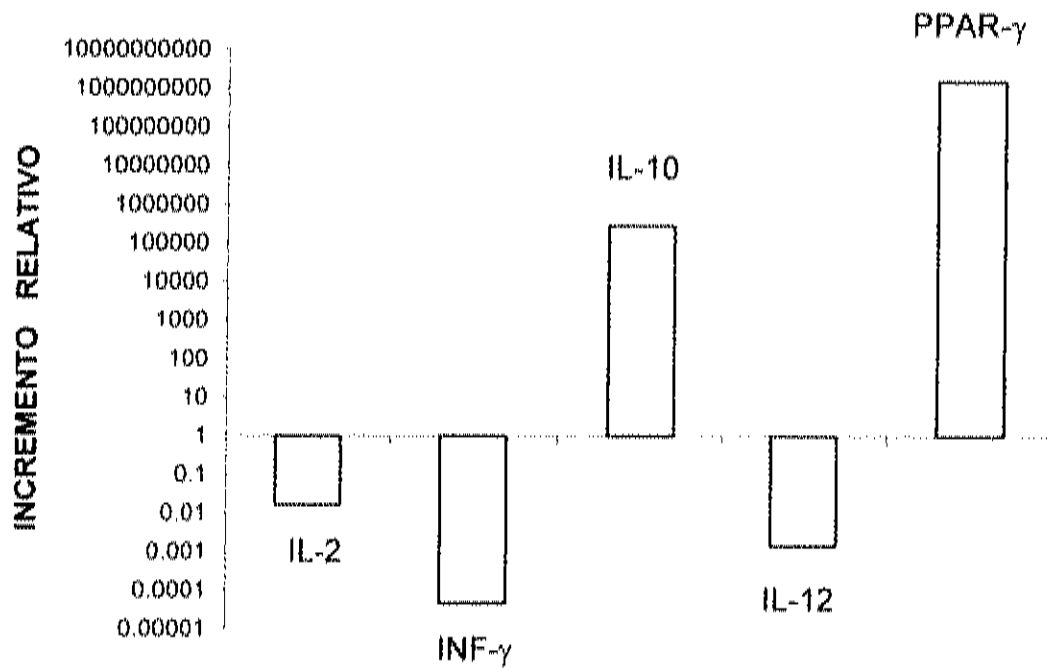


Figura 6. Incremento relativo de los transcritos de IL-2, INF- γ , IL-10, IL-12 y PPAR- γ de CMN suplementadas con una mezcla 1:1 de CLA (100 μ M), durante 24 horas respecto a CMN no suplementadas. Se utilizó PCR tiempo real utilizando el gen constitutivo PPIA₂ y el programa LinRegPCR para linealizar los datos (n=3) (p>0.05).

8. CONCLUSIONES

En la primera parte de este trabajo, que fue la evaluación de la producción de citocinas Th1 y Th2 a través de citometría de flujo, se observa que no hay efectos por parte del CLA. Sin embargo, en el análisis de los transcritos de estas citocinas, se observa una disminución para el $\text{INF-}\gamma$, y un aumento para la IL-10; mientras que para las citocinas IL-2 e IL-12 se observa una disminución. Lo cual podría sugerir una tendencia hacia la respuesta Th2. Además, el factor de transcripción PPAR- γ se observó aumentado, por ser un ligando de alta afinidad por el CLA.

Además los resultados sugieren que dependiendo del isómero empleado y de su concentración pueden obtenerse resultados diferentes. Siendo indiscutible el hecho de que el CLA participa en la producción de citocinas, sugiriendo una posible polarización hacia la respuesta Th2.

El realizar más experimentos en los que se utilicen los isómeros de manera individual abrirá un panorama más amplio en el uso del CLA para mejorar la respuesta inmune, particularmente en el cerdo, logrando con esto nuevas estrategias en el mejoramiento de la producción porcina.

9. REFERENCIAS

- Abbas K, Lichtman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular*. 4th ed. España: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002.
- Akahoshi A, Goto Y, Murao K, Moyazaki T, Yamazaki M, Nonaka M, *et al*. Conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokine levels of mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:916-920.
- Albers R, Vander-Wielen R, Brink E, Hendricks H, Dorovoska-Taran V, Mohede E. Effects of *9 cis 11 trans* and *10 trans 12 cis* conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur J Clin Nutr* 2003; 25:595-603.
- Bassaganya-Riera J, Hontacillas-Magarzo R, Bregendaht K, Wannemeuhler M, Zimmerman D. Effects of dietary conjugated linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune competence. *J Anim Sci* 2000; 79:714-721.
- Bassaganya-Riera J, Hontencillas R, Zimmerman D, Wannemuehler M. Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine CD8+ lymphocytes. *J Nutr* 2001; 131: 2370-2377.
- Bassaganya-Riera J, Pogranichniy R, Jobgen S, Halbur P, Yoon K, O'Shea M, *et al*. Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *J Nutr* 2003; 133:3204-3214.
- Belury M, Moya-Camarena S, Lu M, Shi L, Leesnitzer L, Blanchard S. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome

- proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Nutr Res* 2002; 22:817-824.
- Belury M. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:505-531.
- Castellanos T. El ácido linoleico conjugado como regulador de la lipoproteína lipasa y apolipoproteína C-III en ratones [Tesis de maestría]. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C; 2002.
- Chew B, Wong T, Shultz T, Magnuson N. Effects of conjugated linoleic acid and beta-carotene in modulating lymphocyte and macrophage function. *Anticancer Res* 1997; 17:1099-1106.
- Cook M. Regulation of eicosanoid pathways: a pathway to health and development. *J Nutr* 2002. 1:103-105.
- Corino C, Bontempo V, Sicannimanico D. Effects of dietary conjugated linoleic acid on some specific immune parameters and acute phase protein in weaned piglets. *J Anim Sci* 2001; 78:119-117.
- Dawson H, Beshah E, Nishi S, Solano-Aguilar G, Morimoto M, Zhao A, *et al.* Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infection and immunity* 2005; 73:1116-1128 .
- Delerive P, Fruchart J, Staels B. Peroxisome proliferators-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 2001;169:453-459.

- Dugan M, Aalhus J, Kramer J. Conjugated linoleic acid pork research. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:1212S-1216S.
- Groot J, Kruijt L, Scholten J, Boersma W, Buist W, Engel B, *et al.* Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs. *Immunology* 2005; 115:495-505.
- Hargrave K, Li C, Meyer B, Kachman S, Hartzell D, Della-Fera M, *et al.* Adipose depletion and apoptosis induced by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in mice. *Obesity Research* 2002; 10:1284-1290.
- Harris S, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R. Prostaglandins as modulators of immunity. *Immunol* 2002; 22:144-150.
- Hontecillas R, Wannemeulher M, Zimmerman D, Hutto D, Wilson J, Ahn D, *et al.* Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. *J Nutr* 2002; 132:2019-2027.
- Houseknecht K, Cole B, Steele P. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: A review. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 22:1-23.
- Jones D, Manning B, Daynes R. A role for the peroxisome proliferator-activated receptor α in T-cell physiology and ageing immunobiology. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61:363-369.
- Kelley D, Simon V, Taylor P, Rudolph I, Benito P, Nelson G, *et al.* Dietary supplementation with conjugated linoleic acid increases its concentration in

human peripheral blood mononuclear cells, but did not alter their function. *Lipids* 2001; 36:669-674.

Kelley D, Warren J, Simon V, Bartolini G, Mackey B, Erickson K. Similar effects of c9,t11-CLA and t10,c12-CLA on immune cell functions in mice. *Lipids* 2002; 37:725-728.

Kelly G. Conjugated linoleic acid: A review. *Altern Med Rev* 2001; 6:367-382.

Kepler R, Hirons K, McNeill J, Tove S. Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1966; 241:1350-1358.

Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Role of PPARs in health and disease. *Nature* 2000; 405:421-424.

Khanal R y Dhiman T. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *J Nutr* 2004; 3:72-81.

Kolenko V, Rayman P, Roy B, Cathcart M, O'shea J, Tubbs R, *et al.* Downregulation of JAK3 protein levels in T lymphocytes by prostaglandin E₂ and other cyclic adenosine monophosphate-elevating agents: impact on interleukin-2 receptor signaling pathway. *Blood* 1999; 93:2308-2318.

Lai L, Ying J, Li D, Zhao L, Chen X. Effects of dietary conjugated linoleic acid supplementation on performance and immune function of weaned pigs. *Arch Anim Nutr* 2005a; 59:41-51.

- Lai L, Ying J, Li D, Zhao L, Qiao S, Xing J. Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of pro-inflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolisaccharide. *J Nutr* 2005b; 135:239-244.
- Lawrence T, Wolloughby D, Gilroy D. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature* 2002; 2:787-795.
- Li G, Barnes D, Butz D, Bjorling D, Cook M. 10t, 12c-conjugated linoleic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase expression in vitro and in vivo. *J Lipid Res* 2005; 46:2134-2142.
- Loscher C, Draper E, Leavy O, Kelleher D, Mills K, Roche H. Conjugated linoleic acid suppresses NF- κ B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *The Journal of Immunology* 2005; 175:4990-4998.
- Luongo D, Bergamo P, Rossi M. Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jukart T cells. *Immunol lett* 2003; 90:195-201.
- MacDonald H. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *J Am Coll Nutr* 2000; 19:111-118
- Mathews C y Van Holde K. *Bioquímica*. 2th ed. España: Mc Graw-Hill Interamericana; 2001.
- Moya-Camarena S y Belury M. Species differences in the metabolism and regulation of gene expression by conjugated linoleic acid. *Nutr Rev* 1999; 57:336-340.

- Moya-Camarena S, Vanden Heuvel J, Blanchard S, Leesnitzer L, Belury M. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J Lipid Res* 1999; 40:1426-1433.
- National Research Council (NRC). Nutrient Requirement of Swine. 10th revised edition. National Academic Press. Washington D.C USA. 1998.
- Nettleton J. Omega-3 Fatty Acids and Health. Estados Unidos de América: Chapman and Hall; 1995.
- O'shea M, Bassaganya-Riera J, Mohede I. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:1199S-1206S.
- Pariza M, Park Y, Cook M. Mechanism of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *P.S.E.B.M.* 2000; 223:8-13.
- Pariza M, Park Y, Cook M. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 2001; 40:283-298.
- Quintana J. Proliferación de células mononucleares del cerdo suplementadas *in vitro* con ácido linoleico conjugado (CLA). [Tesis de licenciatura]; Universidad de Sonora. 2006
- Sipos W, Duvigneau J, Willheim M, Schilcher F, Hartl R, Hofbauer G, *et al.* Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunop* 2004; 90:63-71.

- Sugano M, Tsujita A, Yamasaki M, Noguchi M, Yamada K. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 1998; 33:521-527.
- Sugano M, Yamasaki M, Yamada M, Huang K. Effect of conjugated linoleic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and immune function. In "Advances in Conjugated Linoleic Acid Research" ed. By. Yurawecz MP, Mossoba MM, Kramer JK, Pariza MW, Nelson GJ. AOCS Press, Campaign, 1999; 1:327-339.
- Van der Pouw Kraan T, Boeije L, Smeenk T, Wijdenes J, Ader L. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181:327-339.
- Wahle K, Heys S, Rotondo D. Conjugated linoleic acids: are the beneficial or detrimental to health?. *Prog Lipid Res* 2004; 43:553-587.
- Weber T, Schinckel A, Houseknecht K, Richert T. Evaluation of conjugated linoleic acid and dietary antibiotics as growth promotants in weanling pigs. *J Anim Sci* 2001; 79:2542-2549.
- Yamasaki M, Chujo H, Hirao A, Koyanagi N, Okamoto T, Tojo N, *et al.* 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* 2003;133:784-788
- Yang M y Cook M. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumour necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med* 2003; 228:51-58.

Yu Y, Correll P, Vanden Heuvel J. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *BBA* 2002; 1581:89-99

Yu Y, Correll P, Vanden Heuvel J. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *BBA* 2002; 1581:89-99