



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

## **CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

**CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE VERRACOS  
ALIMENTADOS CON DIETAS ADICIONADAS CON ÁCIDO  
LINOLEICO CONJUGADO O NUCLEÓTIDOS, Y  
COMPORTAMIENTO SEXUAL DE VERRACOS CASTRADOS  
TRATADOS CON PGF<sub>2α</sub>**

**VICENTE ZAMORA ZAMORA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2010**

**CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE VERRACOS ALIMENTADOS CON DIETAS  
ADICIONADAS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO O NUCLEÓTIDOS, Y  
COMPORTAMIENTO SEXUAL DE VERRACOS CASTRADOS TRATADOS CON  
PGF<sub>2α</sub>**

La presente tesis, titulada: **Característica seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos, y comportamiento sexual de verracos castrados tratados con PGF<sub>2α</sub>**, realizada por el alumno: **Vicente Zamora Zamora**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



DR. JOSÉ LUIS FIGUEROA VELASCO

ASESOR:



DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR:



DRA. MA. TERESA SÁNCHEZ-TORRES ESQUEDA

ASESOR:



DR. VICENTE OCTAVIO MEJÍA VILLANUEVA

ASESOR:



DR. CARLOS NARCISO GAYTÁN

CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE VERRACOS ALIMENTADOS CON DIETAS  
ADICIONADAS CON ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO O NUCLEÓTIDOS, Y  
COMPORTAMIENTO SEXUAL DE VERRACOS CASTRADOS TRATADOS CON  
PGF<sub>2α</sub>

Vicente Zamora Zamora, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

La composición nutrimental de la dieta afecta las características del semen y composición de nutrientes del espermatozoide. El comportamiento sexual en machos no está completamente relacionado con las hormonas esteroides producidas en el testículo. Se realizaron dos experimentos para evaluar el potencial de la adición de ácido linoleico conjugado (ALC; experimento 1) o nucleótidos (experimento 2) a dietas para verracos para mejorar las características seminales y modificar el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. Adicionalmente se evaluó el comportamiento sexual y concentración de hormonas específicas en verracos castrados tratados con PGF<sub>2α</sub> (experimento 3). En el experimento 1, los tratamientos evaluados fueron: T1) Dieta testigo y T2) Dieta con 1% de ALC, y en el experimento 2 fueron: T1) Dieta testigo y T2) Dieta con 0.65% de nucleótidos. En el experimento 1, el consumo de la dieta adicionada con ALC no afectó las características del semen o el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. En el experimento 2, el consumo de nucleótidos afectó negativamente las características seminales; además modificó el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. En el experimento 3, nueve verracos castrados fueron asignados aleatoriamente a tres tratamientos en un diseño de cuadro latino de 3×3 (con tres repeticiones). Los tratamientos fueron 3 dosis de PGF<sub>2α</sub> (0, 10 y 20 mg) y tres periodos de tratamiento, con 5 d entre periodos. La concentración de testosterona, estradiol, LH, prolactina y cortisol en suero sanguíneo no fue afectada ( $P \geq 0.05$ ) por el tratamiento con PGF<sub>2α</sub>. Las variables del comportamiento sexual en los verracos tratados con PGF<sub>2α</sub> fueron diferentes ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al tratamiento testigo. En conclusión, los resultados obtenidos indican que la composición nutrimental de la dieta afecta de forma diferente las características seminales y el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. Además, aunque el tratamiento con PGF<sub>2α</sub> no afecta la concentración hormonal, pero restablece temporalmente el deseo sexual.

**Palabras clave:** ALC, calidad seminal, comportamiento reproductivo, nucleótidos, verracos.

SEMINAL CHARACTERISTICS OF BOARS FED CONJUGATED LINOLEIC ACID OR  
NUCLEOTIDES SUPPLEMENTED DIETS, AND SEXUAL BEHAVIOR OF  
CASTRATED BOARS TREATED WITH PGF<sub>2α</sub>

Vicente Zamora Zamora, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

The nutritional composition of the diet affects semen characteristics and nutrient composition of the spermatozoa. The sexual behavior of boars is not completely related to steroid hormones produced in the testis. Two experiments were conducted to evaluate the potential of conjugated linoleic acid (CLA; experiment 1) or nucleotides (experiment 2) addition to boar diet to improve semen characteristics and to modify the spermatozoa fatty acid profile. Additionally, to evaluate the sexual behavior and concentration of specific hormones in castrated boars treated with PGF<sub>2α</sub> (experiment 3). In experiment 1, the treatments were as follows: T1) Control diet, and T2) Diet with 1% CLA; and in the experiment 2: T1) Control diet, and T2) Diet with 0.65% of nucleotides. In experiment 1, feed intake of diets supplemented with CLA did not affect semen characteristics or spermatozoa fatty acid profile. In experiment 2, the intake of nucleotides negatively affected semen characteristic, and modified spermatozoa fatty acid profile. In experiment 3, nine adult castrated boars were randomly assigned to three treatments in a 3×3 latin square design (with three replicates). Treatments were three doses of PGF<sub>2α</sub> (0, 10 and 20 mg) and three periods of treatment, with 5 d between each period. Serum concentration of estradiol, LH, prolactin and cortisol in blood serum were not affected ( $P \geq 0.05$ ) by PGF<sub>2α</sub> treatment. Sexual behavior variables in boars treated with PGF<sub>2α</sub> were different ( $P \leq 0.05$ ) from that of control treatment. In conclusion, data from these trials point out that nutritional composition of the diet affects differently the seminal characteristics and spermatozoa fatty acid profile. Furthermore, although PGF<sub>2α</sub> treatment does not affect hormones concentration, but it temporarily restores the sexual drive.

**Keywords:** boars, CLA, nucleotides, semen quality, sexual behavior.

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

A Dios todo poderoso por darme la oportunidad de vivir y disfrutar de la grandeza de su creación.

A mis padres: Leonides Josefina Zamora Ramírez y Francisco Zamora Amador, por su cariño e interés en mi superación personal.

A Karla Cruz García, por brindarme su amor, apoyo y paciencia durante todo este tiempo.

A mis hermanos: Oscar, Felicitas, Cristina y Alonso, por creer en mí.

A mis sobrinas: Melanie Wendy, Ashley, y Analis, que aunque estén muy lejos de México siempre las tenemos presentes.

A mi tío Ruben Zamora Ramírez, por creer mi y estar orgulloso de todos mis logros académicos.

De manera especial a Miguel Salinas Romero y a su familia por su amistad, confianza y por todos los detalles que han tenido hacia mi persona durante todo este tiempo.

A todos mis amigos del Colegio de Postgraduados.

A todas aquellas personas que han sido parte de la historia de mi vida, gracias.

Vicente Zamora Zamora

## AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Colegio de Postgraduados, ha financiado parte de mi formación profesional.

Al Dr. José Luis Figueroa Velasco, por su guía, paciencia, confianza, amistad y sabios consejos durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A la Dra. María Teresa Sánchez-Torres Esqueda, por su amistad y apoyo para en la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Dr. Mario A. Cobos Peralta, por sus observaciones, correcciones y sugerencias para mejorar estos trabajos de investigación.

Al Dr. V. Octavio Mejía Villanueva, por su aporte para mejorar este trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Narciso Gaytán, por sus comentarios para mejoramiento de esta tesis.

A la Ph. D. Nathalie L. Trottier y al M. Sc. Rodrigo Manjarin, por aceptar que hiciera la estancia de investigación en el Department of Animal Science, Michigan State University.

Al M.V.Z. José Luis Cordero Mora y al M.C. Rafael Nieto Aquino, por su colaboración y apoyo brindado durante la realización de la fase de campo de los experimentos.

Al Biólogo Mario Cárdenas y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Hormonas Proteicas, del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Subirán, por su apoyo en el análisis hormonal del experimento “Comportamiento sexual de verracos castrados tratados con  $PGF_{2\alpha}$ ”.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
1. Planteamiento del problema.....	4
2. Objetivos .....	5
2.1. General .....	5
2.2. Específicos .....	5
3. Hipótesis .....	6
4. Revisión de literatura .....	7
4.1. Ácido linoleico conjugado .....	7
4.1.1. Síntesis de ácido linoleico conjugado .....	9
4.1.2. Propiedades biológicas del ácido linoleico conjugado .....	12
4.1.2.1. Actividad anticarcinogénica .....	13
4.1.2.2. Actividad antiaterogénica.....	22
4.1.2.3. Actividad antidiabetogénica.....	29
4.1.2.4. Actividad sobre la composición corporal.....	35
4.1.2.5. Regulación del sistema inmune.....	49
4.1.2.6. Actividad antioxidante y prooxidante .....	52
4.2. Nucleótidos .....	60
4.2.1. Síntesis de los nucleótidos .....	60
4.2.2. Absorción de los nucleótidos .....	63
4.2.3. Funciones biológicas de los nucleótidos.....	65
4.2.3.1. Efectos en el tubo digestivo .....	65
4.2.3.2. Efectos sobre el sistema inmune .....	66
4.2.3.3. Efectos sobre el metabolismo de los lípidos .....	67
4.2.3.4. Efectos sobre la función hepática.....	68
4.3. Prostaglandinas .....	69
4.3.1. Síntesis de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ .....	70
4.3.2. $PGF_{2\alpha}$ y comportamiento sexual en cerdos.....	72
5. Literatura citada .....	77



<b>CAPITULO I. POTENCIAL DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (ALC) PARA MEJORAR LAS CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN Y MODIFICAR EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ESPERMATOZOIDE DEL CERDO .....</b>	<b>113</b>
1. Introducción .....	115
2. Materiales y métodos .....	116
3. Resultados .....	121
4. Discusión .....	122
5. Conclusiones .....	125
6. Literatura citada .....	126
<b>CAPITULO II. ADICIÓN DE NUCLEÓTIDOS A DIETAS ESTÁNDAR PARA VERRACOS PARA MEJORAR LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES IN VITRO .....</b>	<b>140</b>
2.1. Introducción .....	142
2.2. Materiales y métodos .....	143
2.3. Resultados .....	147
2.4. Discusión.....	149
2.5. Conclusiones .....	151
2.6. Literatura citada .....	152
<b>CAPITULO III. SEXUAL BEHAVIOR OF CASTRATED BOARS TREATED WITH PROSTAGLANDIN F<sub>2α</sub>.....</b>	<b>162</b>
3.1. Introduction.....	163
3.2. Material and methods.....	164
3.3. Results.....	166
3.4. Discussion .....	166
3.5. References.....	169
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....</b>	<b>175</b>
1. Conclusiones.....	175
2. Recomendaciones .....	176
<b>ANEXOS .....</b>	<b>177</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Isómeros del ALC encontrados en la grasa de leche, quesos y carne de res .....	7
Cuadro 2. Concentración de glucosa e insulina en ratones Knockout alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol, adicionada con 1% de ácido linoleico (testigo), 1% del isómero <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 12, ó 1% del isómero <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12.....	32
Cuadro 3. Cambios en la sensibilidad a la insulina, concentración de insulina y glucosa a partir de las concentraciones basales hasta las 12 semanas de suplementación.....	32
Cuadro 4. Efecto del consumo del ácido linoleico conjugado en la composición de la canal de cerdos y respuesta productiva.....	38
Cuadro 5. Raza, edad o peso, producto y dosis utilizadas en las diferentes evaluaciones del efecto de la aplicación de PGF <sub>2α</sub> exógena sobre el comportamiento sexual de verracos jóvenes .....	74
Cuadro 6. Concentración de hormonas y comportamiento sexual de verracos con implante simulado más aplicación de solución salina, implante con un agonista de GnRH (GnRH <sub>a</sub> ) más aplicación de solución salina e implante de GnRH <sub>a</sub> tratados con PGF <sub>2α</sub> .....	76
Cuadro 7. Composición de las dietas experimentales .....	133
Cuadro 8. Perfil de ácidos grasos de los aceites usados en las dietas experimentales .....	134
Cuadro 9. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales .....	135
Cuadro 10. Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ALC .....	136
Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos de los espermatozoides de verracos alimentados con dietas adicionadas con ALC (g por cada 100 g de lípidos totales) .....	137
Cuadro 12. Características de la canal y testiculares de verracos alimentados con dietas adicionadas con ALC.....	138
Cuadro 13. Composición de las dietas experimentales .....	156
Cuadro 14. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales .....	157
Cuadro 15. Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con nucleótidos.....	158
Cuadro 16. Perfil de ácidos grasos de los espermatozoides de verracos alimentados con dietas adicionadas nucleótidos (g por cada 100 g de lípidos totales) .....	159
Cuadro 17. Características de la canal y testiculares de verracos alimentados con dietas adicionadas con nucleótidos .....	160
Table 18. Serum hormone concentration in castrated boars, before and after treatment with PGF <sub>2α</sub> .....	173
Table 19. Sexual behavior characteristics of castrated boars treated with PGF <sub>2α</sub> .....	174

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido linoleico y de los dos principales isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado.....	8
Figura 2. Rutas de biohidrogenación de los ácidos oleico, linoleico y, $\alpha$ y $\gamma$ linolénico en el rumen.....	10
Figura 3. Producción ruminal del isómero <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 (ALC) y su síntesis en tejidos mediante la enzima $\Delta$ 9-desaturasa.....	11
Figura 4. Inhibición del crecimiento de células cancerígenas de la glándula mamaria de ratas, cultivadas por 96 h con 32 $\mu$ M de ALC o AL.....	14
Figura 5. Comparación del ALC con otros antioxidantes .....	15
Figura 6. Incremento del índice apoptótico inducido por el ALC en la mucosa del colon de ratas con cáncer inducido.....	15
Figura 7. Concentración de ALC en tejidos en función de la concentración del ALC en la dieta .....	16
Figura 8. Efecto del ALC en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos de la mucosa del colon de ratas con cáncer inducido.....	16
Figura 9. Cambio de los metabolitos del AL en tejido mamario de ratas por efecto del consumo de ALC .....	17
Figura 10. Efecto del ALC en la concentración de prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) y troboxano B2 (TXB2) de la mucosa del colon de ratas con cáncer inducido .....	18
Figura 11. Apoptosis y disminución de la proteína bcl-2 inducida por el ALC en células cancerígenas.....	19
Figura 12. Posible mecanismo de cómo el ALC puede regular el ciclo celular y la apoptosis.. ..	20
Figura 13. Viabilidad de células cancerígenas de colon incubadas con tres isómeros de ALC (200 $\mu$ M) durante 72 horas .....	21
Figura 14. Fragmentación de ADN (apoptosis) en células cancerosas de colon tratadas con tres isómeros de ALC (200 $\mu$ M).....	22
Figura 15. Incidencia de esteatosis hepática en ratones libres de ApoE que fueron alimentados con una dieta testigo (A y B), y dietas adicionadas con el isómero <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 (C y D) e isómero <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 (E y F) .....	23
Figura 16. Cambio del peso del hígado y concentración de triglicéridos en hígado de ratones C57Bl/6j alimentados durante cuatro semanas con dos de los principales isómeros del ALC .....	24

Figura 17. Expresión de genes que codifican la transcripción del PPAR $\gamma$ y ácido graso sintasa en ratones C57Bl/6j alimentados durante cuatro semanas con dietas que contenían 2% de aceite de girasol (testigo), 2% de aceite de girasol más 0.4% de ácido linoleico, 0.4% del isómero <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 ó 0.4% del isómero <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12.....	25
Figura 18. Lesiones ateroscleróticas en aorta de ratones ApoE <sup>-/-</sup> .....	26
Figura 19. Concentración plasmática de la apolipoproteína B en ratones C57Bl/6j alimentados durante cuatro semanas con alguno de los isómeros del ALC .....	27
Figura 20. Concentración de glucosa e insulina en suero de ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas adicionadas con ALC.....	30
Figura 21. Efecto del isómero <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en adipocitos 3T3-L1 .....	31
Figura 22. Distribución del tamaño de los adipocitos en la grasa retroperitoneal de ratas alimentadas durante 5 semanas con dietas adicionadas con 0, 0.25 ó 0.50% de ALC .....	35
Figura 23. Disminución en el tamaño y número de adipocitos en cerdos alimentados con una dieta con base maíz-cebada-pasta de soya suplementada con 0.75% de ALC .....	36
Figura 24. Posibles mecanismos por los cuales el isómero <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 puede disminuir la acumulación de triglicéridos en los (pre)adipocitos diferenciados.....	43
Figura 25. Apoptosis inducida por el consumo de ALC en tejido adiposo .....	44
Figura 26. Cambios morfológicos inducidos por el isómero <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 en los adipocitos, por medio de la regulación a nivel transcripcional, traslacional y postranscripcional de las proteínas asociadas a las gotas lipídicas.....	45
Figura 27. Alteración de la morfología de las gotas lipídicas por el isómero <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 ..	46
Figura 28. Reducción en la concentración de la leptina por efecto del consumo de ALC (mezcla de isómeros <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 y <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12) en tejido adiposo perirenal de ratas.....	47
Figura 29. Concentración de leptina en plasma sanguíneo de ratones C57B/6j que consumieron ALC durante 6 meses.....	47
Figura 30. Concentración plasmática de adiponectina en ratas Zucker diabéticas obesas (fa/fa) y ratas con hipertensión espontánea (SHRs) .....	48
Figura 31. Efecto del ALC en la concentración plasmática de TNF- $\alpha$ en ratones C57Bl/6j y ratas Sprague-Dawley .....	49
Figura 32. Comparación del ALC con otros antioxidantes .....	53
Figura 33. Concentración de glutatión (GSH) en células suplementadas con ácido $\gamma$ -linolénico (GLA), ácido araquidónico (AA), ácido $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido eicopentanoico (EPA) o ácido linoleico conjugado (ALC) .....	54

Figura 34. Lipoperoxidación medida como contenido celular de malondialdehído (MDA) después de dos periodos de suplementación con ácido $\gamma$ -linolénico (GLA), ácido araquidónico (AA), ácido $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido eicopentanoico (EPA) o ácido linoleico conjugado (ALC) .....	54
Figura 35. Efecto del ALC sobre la actividad específica de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) en hepatocitos de rata.....	55
Figura 36. Efecto del ALC, vitamina E o BHA sobre las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la glándula mamaria de ratas Sprague-Dawley .....	55
Figura 37. Efecto de la adición de ácido linoleico conjugado (ALC) en la oxidación de aceite de canola a 90 °C.....	57
Figura 38. Valor total de la capacidad de eliminación de oxiradicales de los isómeros del ALC ( <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 y <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12), ácido linoleico, $\alpha$ -tocoferol, L-ácido ascórbico. 58	
Figura 39. Acción protectora de los isómeros de ALC contra la inactivación de la paraoxonasa 1 (PON1) por el ascorbato/ $\text{Cu}^{2+}$ ..	59
Figura 40. Regulación metabólica de los nucleótidos en el enterocito en presencia y ausencia de nucleótidos en la dieta.....	61
Figura 41. Rutas metabólicas de las purinas y pirimidinas .....	62
Figura 42. Digestión y absorción de los ácidos nucleicos y sus productos.. .....	64
Figura 43. Síntesis del ácido araquidónico a partir del ácido linoleico dietario.....	70
Figura 44. Ruta metabólica para sintetizar $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir de ácido araquidónico.. .....	71
Figura 45. Ruta metabólica de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de la membrana celular.. .....	73
Figura 46. Porcentaje acumulativo de verracos que fueron tratados con $\text{PGF}_{2\alpha}$ o agua desionizada y que fueron entrenados para montar una cerda artificial para la colección de semen en cada sesión.. .....	75
Figure 47. Boars mounting from 20 to 30 d after castration .....	172

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	=	Ácido araquidónico
ACBP	=	Proteína unidora del acil-CoA
ACC	=	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	=	Aceite crudo de soya
AdipoR-1	=	Receptor 1 para adiponectina
AdipoR-2	=	Receptor 2 para adiponectina
ADN	=	Ácido desoxirribonucleico
ADRP	=	Proteína relacionada con la diferenciación del adipocito
AG	=	Ácidos grasos
AL	=	Ácido linoleico
ALA	=	Ácido $\alpha$ -linolénico
ALC	=	Ácido linoleico conjugado
AML	=	Área del músculo <i>Longissimus</i>
aP2	=	Proteína de unión de los ácidos grasos
APRT	=	Adenina fosforribosiltransferasa
ARN	=	Ácido ribonucleico
ATDER	=	Área transversal del testículo derecho
ATIZQ	=	Área transversal del testículo izquierdo
ATP	=	Adenosín trifosfato
BHA	=	Butilhidroxianisol
BTH	=	Butilhidroxitolueno
C/EBP $\alpha$	=	Proteína alfa unida a incrementadores CCAAT
cAMP	=	Adenosín monofosfato cíclico
CDP-diacilglicerol	=	Citidina difosfato diacilglicerol
cGMP	=	Guanosín monofosfato cíclico
Cox-1	=	Ciclooxigenasa 1
Cox-2	=	Ciclooxigenasa 2
E <sub>2</sub>	=	Estradiol

EPA	=	Ácido eicopentanoico
ERO	=	Especies reactivas de oxígeno
FAD	=	Dinucleótido de flavina-adenina
FAT/CD36	=	Translocasa de ácidos grasos
FSH	=	Hormona folículo estimulante
GD	=	Grasa dorsal
GLA	=	Ácido $\gamma$ -linolénico
GLUT4	=	Transportador de glucosa 4
GPx	=	Glutación peroxidasa
GR	=	Glutation reductasa
GSH	=	Glutation
GTP	=	Guanosín trifosfato
HDL	=	Lipoproteínas de alta densidad
HETEs	=	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
HGPRT	=	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
HLS	=	Lipasa sensible a hormonas
HPETEs	=	Ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos
IA	=	Inseminación artificial
IFN $\gamma$	=	Interferón gamma
IgA	=	Inmunoglobulina A
IgE	=	Inmunoglobulina E
IgG	=	Inmunoglobulina G
IgM	=	Inmunoglobulina M
IL-1 $\beta$	=	Interleucina 1 beta
IL-2	=	Interleucina 2
IL-4	=	Interleucina 4
IL-6	=	Interleucina 6
I $\kappa$ B $\alpha$	=	Factor nuclear alfa del incrementador del gen de la proteína de cadena ligera kappa en inhibidores de células B
LDL	=	Lipoproteínas de baja densidad

LH	=	Hormona luteinizante
LPL	=	Lipasa lipoprotéica
MCP-1	=	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MIF	=	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MnSOD	=	Manganeso-superóxido dismutasa
mTOR	=	Blanco de la rapamicina en mamíferos
N <sup>10</sup> -formilTHF	=	Ácido N <sup>10</sup> -formiltetrahidrofólico
NAD	=	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NF κB	=	Factor nuclear kappa B
NSAIDs	=	Drogas anti-inflamatorias no esteroideas
OPRT	=	Orotidina fosforribosiltransferasa
PCAM-1	=	Molécula de adhesión celular de plaquetas/endotelial
PG's	=	Prostaglandinas
PGE <sub>1</sub>	=	Prostaglandina E <sub>1</sub>
PGE <sub>2</sub>	=	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	=	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	=	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	=	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGHS-1	=	Ciclooxigenasa 1
PGHS-2	=	Ciclooxigenasa 2
PGI <sub>2</sub>	=	Prostaglandina I <sub>2</sub>
Pi	=	Fosfóro inorgánico
PLA <sub>2</sub>	=	fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	=	fosfolipasa C
PON1	=	Proteína paraoxonasa 1
PPARs	=	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPARα	=	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa
PPARγ	=	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma
PRL	=	Prolactina
PRPP	=	Fosforribosil pirofosfato



SCD-1	=	Esteroil-CoA desaturasa
SOD	=	Superóxido dismutasa
SREBP-1c	=	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c
T	=	Testosterona
TFX	=	Factor de transcripción no identificado
TNF $\alpha$	=	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA <sub>2</sub>	=	Tromboxano A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	=	Tromboxano B <sub>2</sub>
UCP2	=	Proteína desacopladora 2
UDP-glucosa	=	Uridina difosfato glucosa
VLDL	=	Lipoproteínas de muy baja densidad

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La eficiencia reproductiva de las explotaciones porcinas tiene un importante impacto en la rentabilidad de la industria porcina, es por ello que durante la última década se ha observado un cambio en el manejo reproductivo del pie de cría. Dicha eficiencia comúnmente se evalúa a través de la productividad de la cerda, de la cual, el porcentaje de gestación y la prolificidad son dos parámetros que la afectan significativamente. Estos aspectos están influenciados por numerosos factores que se pueden mejorar al adoptar tecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA). En los últimos años el uso de la IA en las explotaciones porcinas ha ido en aumento, debido a que los resultados obtenidos con el uso de esta tecnología son similares o superiores a los obtenidos con la monta natural (Am-in *et al.*, 2009); además, ayuda a mantener un elevado estatus sanitario de las piaras, hace más eficiente el uso de los recursos genéticos y optimiza el manejo reproductivo (Thibier y Guerin, 2000; Robinson y Buhr, 2005; Roca *et al.*, 2006) con lo que se reducen los costos de operación de las unidades de producción. Pero el éxito de la IA depende de varios factores entre los que se encuentra la disponibilidad de semen de alta calidad (Thibier y Guerin, 2000; Waberski *et al.*, 2008). Sin embargo, son muchos los aspectos que afectan la producción y calidad del semen, y su impacto es poco conocido. Entre estos factores se ha visto que la nutrición juega un papel importante en las características seminales del eyaculado del cerdo. En algunos estudios se ha visto que el nivel de proteína y energía de la dieta afectan la producción de semen (Louis *et al.*, 1994a,b). También se ha reportado que la adición de ácidos grasos esenciales (Rooke *et al.*, 2001), vitaminas (Audet *et al.*, 2004) o minerales y vitaminas (Marín-Guzmán *et al.*, 1997) a la dieta mejoran algunas características del semen porcino.

Los ácidos grasos son nutrientes importantes en la nutrición de los cerdos, debido a que no sólo son una fuente concentrada de energía, sino porque tienen funciones metabólicas, fisiológicas y estructurales importantes. Algunos ácidos grasos como los de la serie n-3 y n-6 son considerados esenciales debido a que el organismo no los puede sintetizar, por lo que su inclusión en la dieta es indispensable. Además, éste tipo de ácidos grasos, junto con los derivados de su metabolismo, participan en la regulación metabólica, fisiológica y genética (Kliwer *et al.*, 1997; Simopoulos, 2002; Pégorier *et al.*, 2004). Aunque también hay otros

ácidos grasos que se caracterizan por tener efectos detrimentales para la salud, como es el caso de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos *trans* (Sanders, 1988; Gebauer *et al.*, 2007).

Estudios realizados en semen porcino han determinado que la membrana plasmática del espermatozoide del cerdo está compuesta por una elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (Poulos *et al.*, 1973; Poulos *et al.*, 1986). Esta característica indica que la fluidez de la membrana espermática puede ser afectada (Stubbs y Smith, 1984; Aitken, 1995), lo cual repercutiría en la fertilidad de los gametos (Cerolini *et al.*, 2000; Rooke *et al.*, 2001; Blesbois *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha visto que, en la mayoría de las especies animales, el perfil de ácidos grasos en el espermatozoide y semen refleja el consumo de ácidos grasos (Lands, 2005; Wathes *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados de los estudios realizados en los cuales se han evaluado los efectos de la adición de ácidos grasos n-3 a la dieta sobre la calidad del semen porcino han sido inconsistentes (Paulenz *et al.*, 1995; Rooke *et al.*, 2001; Mitre *et al.*, 2004; Strzeżek *et al.*, 2004; Estienne *et al.*, 2008).

El desarrollo de estrategias nutricionales que incrementen la producción y calidad del semen porcino puede ayudar a aumentar la distribución de recursos genéticos de alta calidad para mejorar los parámetros reproductivos y productivos de las explotaciones porcinas. Una estrategia puede ser la adición de ácido linoleico conjugado (ALC) a las dietas para verracos. Aunque el ALC es un grupo de ácidos grasos *trans*, éstos ácidos grasos son de los pocos compuestos a los cuales se les han atribuido varios efectos beneficiosos para la salud, como son sus propiedades anticarcinogénicas, antiaterogénicas, antidiabetogénicas, sobre la composición corporal, el metabolismo energético y la respuesta inmune (Park, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se conoce el efecto de su consumo sobre la producción y calidad del semen en ninguna especie doméstica.

Otra estrategia para mejorar las características seminales de los cerdos puede ser la adición de nucleótidos a la dieta. Aunque estos compuestos no se consideran esenciales, se ha reportado que su incorporación en el alimento promueve el crecimiento y la maduración intestinal (Uauy *et al.*, 1994), mantiene la integridad del epitelio intestinal, reduce la incidencia de enfermedades entéricas (Gonçalves *et al.*, 2005), modifica el tipo y crecimiento de la microflora intestinal (Núñez *et al.*, 1990; Uauy *et al.*, 1994) e incrementa la respuesta

inmune celular y humoral (Carver, 1999; Maldonado *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2008); además, modifica el metabolismo de los lípidos (DeLucchi *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1992; Sánchez-Pozo *et al.*, 1994; Siahianidou *et al.*, 2004). Aunque todos estos efectos sólo se han reportado en individuos lactantes. Al igual que en el caso del ALC, hasta el momento no se conoce el efecto de su consumo en animales adultos, y sobre todo en aspectos reproductivos. Debido a su capacidad para mejorar la salud intestinal y modificar el metabolismo de los lípidos, su adición a las dietas para verracos podría mejorar las características seminales.

Otro aspecto reproductivo importante dentro de las explotaciones porcinas o centros de producción semen es la falta o disminución de la libido, el cual causa inconvenientes al momento de colectar el semen y es una de las principales causas de desecho de sementales de alto valor genético. Se ha reportado que esta característica está positivamente correlacionada con la concentración de testosterona en plasma sanguíneo (Ren *et al.*, 2009); aunque se ha visto mayor correlación con la concentración de estradiol que con la de testosterona, ya que una baja concentración de estradiol en plasma aumenta el tiempo para lograr una monta exitosa (Louis *et al.*, 1994a,b). Además de los efectos de estas dos hormonas esteroides sobre el deseo sexual en cerdos, se ha encontrado que otras hormonas como la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) elevan la libido en verracos jóvenes, maduros y cerdos con baja libido (Szurop *et al.*, 1985; Kozink *et al.*, 2002; Estienne y Harper, 2004; Estienne *et al.*, 2007).

Los mecanismos de cómo la  $PGF_{2\alpha}$  afectan la libido no son claros, pero se ha propuesto que la  $PGF_{2\alpha}$  estimula la secreción de hormonas esteroides (Kozink *et al.*, 2002); sin embargo, se han encontrado resultados controversiales, ya que, mientras algunos autores reportan que la secreción de testosterona y estradiol no cambia (Fonda *et al.*, 1981), otros han encontrado que después de la aplicación de  $PGF_{2\alpha}$  la concentración de testosterona y estradiol en sangre aumenta (Estienne *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha observado que después de la aplicación de  $PGF_{2\alpha}$  se incrementa la concentración de prolactina y cortisol (Fonda *et al.*, 1981); aunque hasta el momento no se sabe nada sobre la función que pueden ejercer estas dos últimas hormonas sobre el deseo sexual, ni tampoco se sabe si la  $PGF_{2\alpha}$  puede afectar el deseo sexual a través de otras vías.

## 1. Planteamiento del problema

La necesidad de incrementar la eficiencia reproductiva y productiva en la industria porcina, con el objetivo de reducir costos de producción y elevar el margen de ganancias ha propiciado un importante cambio en el manejo reproductivo de las unidades de producción. Uno de los cambios es el uso de la IA; sin embargo, para que la implementación de esta tecnología se ha exitosa, se requiere contar con semen con altos estándares de calidad. La nutrición de los cerdos es uno de los factores que afectan la calidad del semen, y por medio de la manipulación de las dietas se puede mejorar esta característica (Louis *et al.*, 1994a,b; Marín-Guzmán *et al.*, 1997; Rooke *et al.*, 2001; Audet *et al.*, 2004). La adición de ácidos grasos esenciales (n-3) a la dieta para verracos ha mostrado que estos nutrientes tienen una alta tasa de transferencia de la dieta a la membrana espermática (Maldjian *et al.*, 2003; Strzeżek *et al.*, 2004), con lo que se mejora el perfil de ácidos grasos de la membrana celular (Strzeżek *et al.*, 2004) y con ello la capacidad fecundante del espermatozoide (Cerolini *et al.*, 2000; Rooke *et al.*, 2001; Blesbois *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos sobre la calidad del semen al adicionar ácidos grasos n-3 a las dietas para verracos son inconsistentes. Por ello, el uso del ALC (un grupo de ácidos grasos con diversas funciones biológicas benéficas) en dietas para verracos, representa una alternativa con potencial para mejorar las características seminales.

Debido a la capacidad de modificar el metabolismo de los lípidos y tener efectos benéficos sobre la salud intestinal y el sistema inmune, la adición de nucleótidos a las dietas para verracos representa otra alternativa con potencial para mejorar las características del semen y el perfil de ácidos grasos de la célula espermática.

Por otro lado, el comportamiento sexual de los verracos, al ser una característica importante para lograr una reproducción exitosa, hace necesario que se clarifiquen los mecanismos de cómo algunas hormonas, como la  $PGF_{2\alpha}$ , incrementan el deseo sexual y con esto, el éxito de la reproducción. Por ello, un modelo en el cual se utilicen verracos castrados es ideal para dilucidar los mecanismos de cómo es que esta hormona aumenta el deseo sexual.

## **2. Objetivos**

### **2.1. General**

Evaluar el potencial del ácido linoleico conjugado y nucleótidos para mejorar las características macro y microscópicas seminales, y modificar el perfil de ácidos grasos del espermatozoide porcino.

Evaluar el comportamiento sexual y concentración de hormonas específicas en verracos castrados tratados con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

### **2.2. Específicos**

- Evaluar los efectos de la adición de ácido linoleico conjugado a dietas estándar para verracos sobre las características del semen, el perfil de ácidos grasos del espermatozoide, y las características de la canal y del testículo.
- Evaluar los efectos de la adición de nucleótidos a dietas estándar para verracos sobre las características del semen, el perfil de ácidos grasos del espermatozoide, las características de la canal y del testículo, y la concentración de urea en plasma.
- Determinar el efecto de la aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a verracos castrados sobre la libido.
- Evaluar el efecto de la aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre la concentración de testosterona, estradiol, LH, prolactina y cortisol en suero sanguíneo de verracos castrados.

### **3. Hipótesis**

Las características macro y microscópicas del semen son mejores en verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos.

La concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en el espermatozoide es mayor en verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos.

La adición de ácido linoleico conjugado o nucleótidos a dietas estándar para verracos disminuye el engrasamiento de la canal y afecta el volumen testicular.

La alimentación de verracos con dietas adicionadas con nucleótidos no incrementa la concentración de urea en plasma.

La aplicación exógena de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  puede restablecer temporalmente la libido en verracos castrados.

La concentración de prolactina y cortisol incrementa en verracos castrados tratados con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

## 4. Revisión de literatura

### 4.1. Ácido linoleico conjugado

El término “ácido linoleico conjugado” (ALC) se refiere a una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados, isómeros posicionales (C6, C8; C7, C9; C8, C10; C9, C11; C10, C12; C11, C13; y C12, C14) y geométricos (*cis*, *trans*; *trans*, *cis*; *cis*, *cis*; y *trans*, *trans*) del ácido linoleico (C18:2; *cis*9, *cis*12) los cuales tienen un sistema de dobles enlaces conjugados, sin estar separados por un grupo metileno (Eulitz *et al.*, 1999). El término ALC incluye un total de 28 isómeros geométricos y posiciones (Collomb *et al.*, 2006), de los cuales 21 han sido identificados en los alimentos (Cuadro 1; Fritsche y Fritsche, 1998; Sehat *et al.*, 1998b; Rickert *et al.*, 1999; Fritsche *et al.*, 2000; Collomb *et al.*, 2001; Dhiman *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Isómeros del ALC encontrados en la grasa de leche, quesos y carne de res.

<i>cis/trans</i> -18:2	<i>cis/cis</i> -18:2	<i>trans/trans</i> -18:2
<i>trans</i> 6, <i>cis</i> 8	<i>cis</i> 7, <i>cis</i> 9	<i>trans</i> 7, <i>trans</i> 9
<i>cis</i> 7, <i>trans</i> 9	<i>cis</i> 8, <i>cis</i> 10	<i>trans</i> 8, <i>trans</i> 10
<i>trans</i> 7, <i>cis</i> 9	<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 11	<i>trans</i> 9, <i>trans</i> 11
<i>cis</i> 8, <i>trans</i> 10	<i>cis</i> 10, <i>cis</i> 12	<i>trans</i> 10, <i>trans</i> 12
<i>trans</i> 8, <i>cis</i> 10	<i>cis</i> 11, <i>cis</i> 13	<i>trans</i> 11, <i>trans</i> 13
<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	<i>cis</i> 12, <i>cis</i> 14	<i>trans</i> 12, <i>trans</i> 14
<i>trans</i> 9, <i>cis</i> 11		
<i>cis</i> 10, <i>trans</i> 12		
<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12		
<i>cis</i> 11, <i>trans</i> 13		
<i>cis</i> 12, <i>trans</i> 14		

En la práctica, el ALC es una mezcla de todos estos isómeros posicionales y geométricos. Se ha encontrado que el contenido de ALC es mayor en los productos de origen animal; dentro de los productos animales, los productos cárnicos y lácteos provenientes de los



rumiantes son las principales fuentes de estos compuestos (Chin *et al.*, 1992; Schmid *et al.*, 2006). De todos los isómeros, se ha encontrado que el isómero biológicamente más activo y abundante es el *cis9, trans11* (Pariza *et al.*, 2000), el cual representa un poco más del 80% del ALC total presente en los alimentos (Churruca *et al.*, 2009). Este isómero en la leche y productos lácteos de rumiantes representa del 80 al 90% (Ha *et al.*, 1989; Parodi, 1977; Chin *et al.*, 1992; Parodi, 1999; Sehat *et al.*, 1998a; Sehat *et al.*, 1999; Collomb *et al.*, 2001; Kraft *et al.*, 2003), mientras que en la carne representa alrededor del 73% (Sehat *et al.*, 1999; Fritsche *et al.*, 2000; Adamczak *et al.*, 2008) de los isómeros totales del ALC. También se ha reportado que el isómero *trans10, cis12* tiene una actividad biológica importante (Kramer *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999a; Park *et al.*, 1999b; Figura 1).

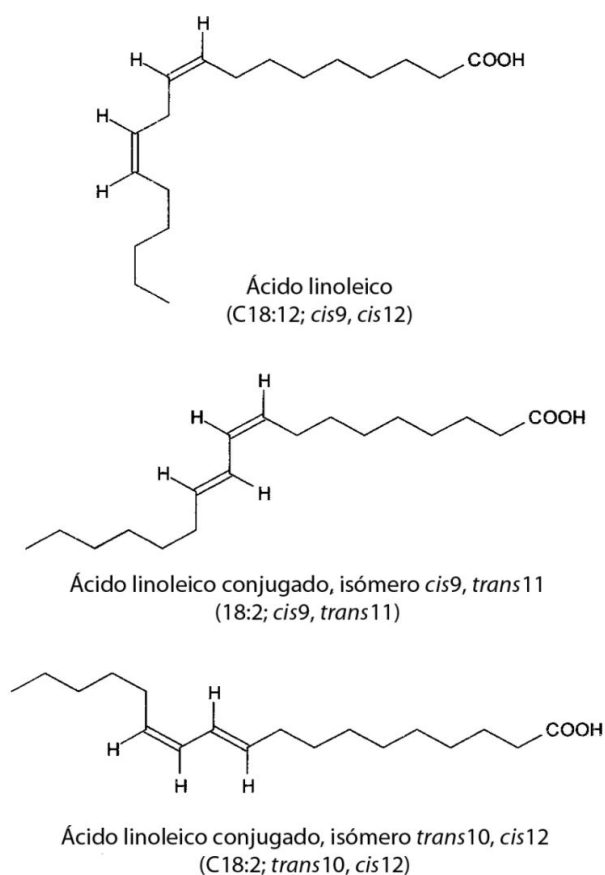


Figura 1. Estructura del ácido linoleico, y de los dos principales isómeros bioactivos del ácido linoleico conjugado. Fuente: Ip *et al.* (2003).

#### 4.1.1. Síntesis de ácido linoleico conjugado

De forma natural el ALC es sintetizado en el rumen como un producto intermedio de la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados (ácido oleico, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolénico y ácido  $\gamma$ -linolénico) para producir ácido vaccénico y finalmente ácido esteárico (Figura 2; Harfoot y Hazlewood, 1988; Griinari y Bauman, 1999; Collomb *et al.*, 2006; Aydin, 2005; Adamczak *et al.*, 2008); dicho proceso de biohidrogenación involucra la isomerización de los ácidos grasos poliinsaturados, la cual está catalizada por una isomerasa producida principalmente por las bacterias ruminales *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Megasphaera elsdenii*. *B. fibrisolvens* isomeriza el ácido linoleico (AL) para producir el isómero *cis*9, *trans*11 (Kepler *et al.*, 1966; Kim *et al.*, 2000); mientras que *Megasphaera elsdenii* lo isomeriza para producir el isómero *trans*10, *cis*12 del ALC (Kim *et al.*, 2002). El isómero *cis*9, *trans*11 del ALC (ácido ruménico), puede ser absorbido e integrado a los tejidos o puede ser biohidrogenado en el rumen para formar ácido vaccénico (C18:1, *trans*11); este último después de ser absorbido puede ser almacenado o convertido a *cis*9, *trans*11 por la incorporación de una doble ligadura *cis* en la posición 9, por acción de la enzima  $\Delta^9$  desaturasa (Bauman *et al.*, 1999; Figura 3).

Debido a que los mamíferos no tienen la enzima  $\Delta^{12}$  desaturasa, el ácido vaccénico absorbido no puede ser transformado a *trans*10, *cis*12, por lo que la presencia de este isómero en los tejidos está determinado por su síntesis en el rumen (Churruca *et al.*, 2009). La cantidad y proporción de los diferentes isómeros de ALC presentes en los productos lácteos y tejidos de los rumiantes depende principalmente del tipo o composición de la dieta que consumen (Stanton *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1998a; Kelly *et al.*, 1998b; Dhiman *et al.*, 1999a; Dhiman *et al.*, 1999b; Dhiman *et al.*, 2000; Chilliard *et al.*, 2000; Collomb *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2005; Nuernberg *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2006; Collomb *et al.*, 2006; Floris *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2006), de la composición de la población microbiana presente en el rumen (Bauman *et al.*, 1999; Adamczak *et al.*, 2008; Churruca *et al.*, 2009), la raza (Lawless *et al.*, 1999; Kelsey *et al.*, 2003), del número de parto o edad del animal (Stanton *et al.*, 1997; Kelsey *et al.*, 2003) y de los aditivos adicionados a la dieta (Bessa *et al.*, 2000).

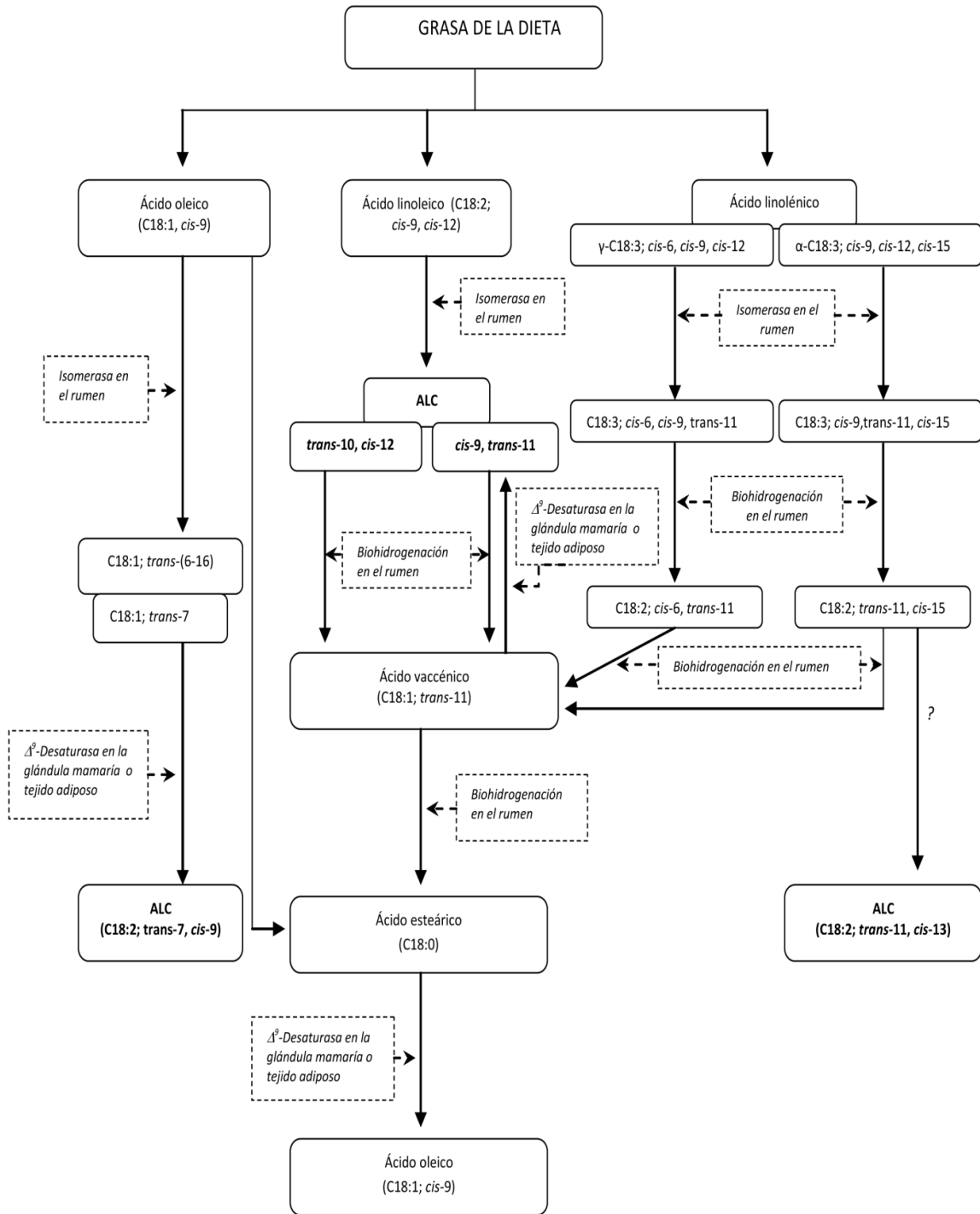


Figura 2. Rutas de biohidrogenación de los ácidos oleico, linoleico y  $\alpha$  y  $\gamma$  linolénico en el rumen. Adaptado de: Harfoot y Hazlewood (1988); Grinari y Bauman (1999); Collomb *et al.* (2006).

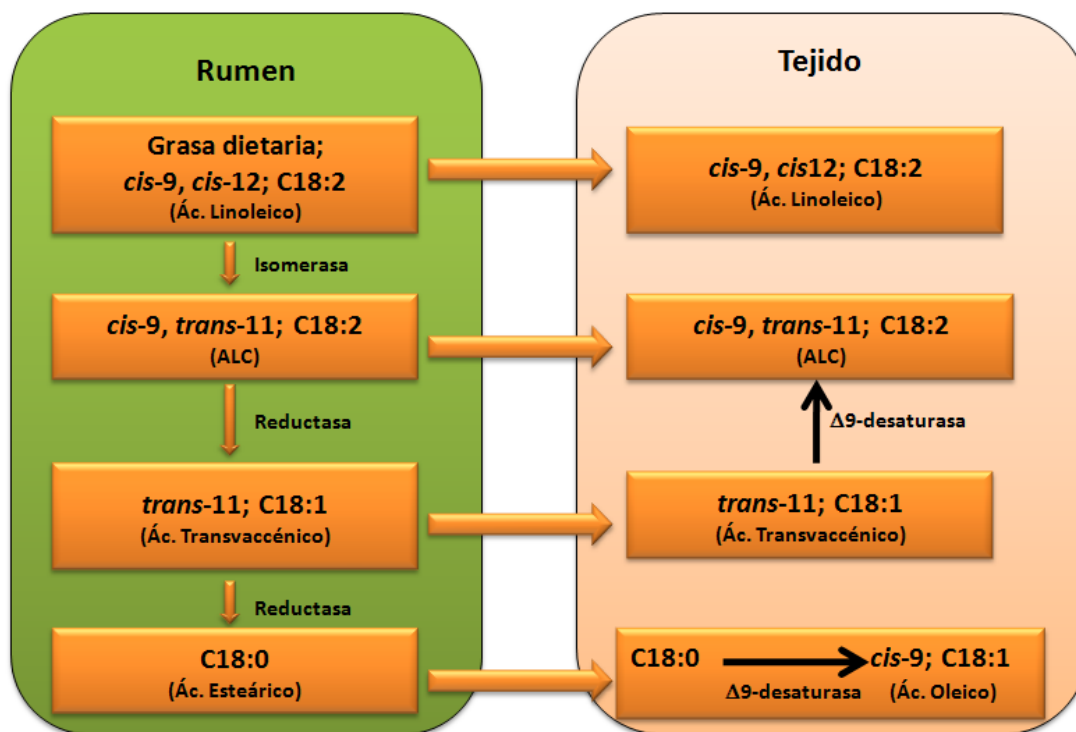


Figura 3. Producción ruminal del isómero *cis*<sub>9</sub>, *trans*<sub>11</sub> (ALC) y su síntesis en tejidos mediante la enzima  $\Delta$ 9-desaturasa. Fuente: Bauman *et al.* (1999); Griinari y Bauman (1999).

En cuanto a los no rumiantes, se ha propuesto que estos pueden sintetizar ALC en el hígado (Santora *et al.*, 2000) y tejido adiposo (Palmquist y Santora, 1999; Looor *et al.*, 2002) a partir del ácido trans-vaccénico dietario.

Industrialmente el ALC puede ser producido a gran escala utilizando métodos químicos. Los dos métodos químicos más utilizados en la producción de ALC son la isomerización de aceites ricos en ácido linoleico o linoleato por medio de catálisis alcalina (Mounts *et al.*, 1970; Chin *et al.*, 1992; Berdeaux *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999; Nagao *et al.*, 2003a; Rocha-Uribe y Hernández, 2004), y por deshidratación de aceites ricos en ácido ricinoleico o sus ésteres utilizando catálisis ácida (Berdeaux *et al.*, 1997; Villeneuve *et al.*, 2005); los productos obtenidos por estos métodos varían en su composición y propiedades físicas, debido a que son una mezcla de los diferentes isómeros (Ma *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003). Las mezclas

sintéticas de ALC comúnmente tienen entre 29 y 41% de los isómeros *cis*9, *trans*11/*trans*9, *cis*11; 29-42% del isómero *trans*10, *cis*12; 1.3-4.8% del isómero *trans*9, *trans*11/*trans*10, *trans*12; y el resto de otros isómeros (Chin *et al.*, 1992; Yurawecz *et al.*, 1995; Christie *et al.*, 1997; Sehat *et al.*, 1998a; Ma *et al.*, 1999; Rocha-Uribe y Hernández, 2004; Uehara *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha encontrado que algunas mezclas sintéticas pueden tener hasta 84.31% de los isómeros *cis*9, *trans*11 y 13.38% de los isómeros *trans*10, *cis*12 y una cantidad menor de otros isómeros (Villeneuve *et al.*, 2005). Esta gran variación ha llevado a buscar y establecer métodos de obtención de productos con una mayor concentración y menor variación de los isómeros *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12. Los métodos propuestos para incrementar la concentración y pureza de los principales isómeros de ALC son la utilización de preparados enzimáticos procedentes de bacterias u hongos en mezclas comerciales de ALC (McNeill *et al.*, 1999; Warwel y Borgdorf, 2000; Lin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007; Goli *et al.*, 2008); el uso de microorganismos como bacterias lácticas para producir selectivamente los isómeros *cis*9, *trans*11 o *trans*9, *trans*11 a partir del ácido linoleico (Kishino *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008) o ácido ricinoleico (Ogawa *et al.*, 2005); y la producción selectiva de los isómeros *cis*9, *trans*11 o *trans*10, *cis*12 a partir de ácido vaccénico (Ando *et al.*, 2009) mediante hongos o levaduras. Además de la purificación de los isómeros *cis*9, *trans*11 o *trans*10, *cis*12, producto de la isomerización alcalina del ácido linoleico conjugado por medio de cristalización a bajas temperaturas en acetona (Berdeaux *et al.*, 1998; Uehara *et al.*, 2006). Una forma rápida y económica de obtener aceites ricos en ALC es con el uso de la fotoirradiación con rayos UV de los aceites vegetales (Jain y Proctor, 2006; Jain y Proctor, 2007; Jain *et al.*, 2008).

#### **4.1.2. Propiedades biológicas del ácido linoleico conjugado**

Entre las propiedades que se le han atribuido al ALC se ha reportado que tiene actividad anticarcinogénica (Ha *et al.*, 1989; Ip *et al.*, 1996; Devery *et al.*, 2001; Pariza *et al.*, 2001), antiaterogénica (Lee *et al.*, 1994; Nicolosi *et al.*, 1997), antidiabetogénica (Houseknecht *et al.*, 1998; Moloney *et al.*, 2007), además de tener la propiedad de modificar la composición corporal (Chin *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1997; Ostrowska *et al.*, 1999), regular la respuesta inmune (Cook *et al.*, 1993; Sugano *et al.*, 1998; Hayek *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2000b;

Kelley *et al.*, 2002; Kelley y Erickson, 2003), y poseer propiedades antioxidantes (Ha *et al.*, 1990; Du *et al.*, 2000; Hur *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2002). Sin embargo, esta última propiedad está en controversia debido a que se ha observado que el ALC también tiene una función prooxidante en condiciones específicas (Chen *et al.*, 1997; Flintoff-Dye y Omaye, 2005; Martin *et al.*, 2008a; Martin *et al.*, 2008c). Los mecanismos de cómo actúa no están determinados, pero se cree que probablemente los efectos del ALC estén relacionados con el metabolismo de los eicosanoides, producción de citoquinas y expresión genética (Hargrave *et al.*, 2004; Azain, 2003; Göttsche y Straarup, 2006; Kelly *et al.*, 2006).

#### **4.1.2.1. Actividad anticarcinogénica**

El interés por el ALC creció desde que Pariza *et al.* (1979) observaron que la carne asada de bovino contenía un componente que inhibía la mutagénesis; dicho componente posteriormente mostró poseer propiedades anticarcinogénicas (Pariza, 1997). Este anticarcinogénico fue purificado y se encontró que eran cuatro isómeros (*cis*9, *trans*11; *trans*10, *cis*12; *trans*9, *trans*11; *trans*10, *trans*12) del AL con un sistema de dobles enlaces en diferentes posiciones (Ha *et al.*, 1989). Posteriormente fue sintetizado por isomerización alcalina del AL para realizar diversos estudios. Los estudios realizados en animales han mostrado que los isómeros del ALC previenen o suprimen el desarrollo de cáncer en el estómago (Ha *et al.*, 1990), glándula mamaria (Ip *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1994; Ip *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1997; Banni *et al.*, 1999), colon (Liew *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2001), piel (Belury *et al.*, 1996), próstata y pulmón (Cesano *et al.*, 1998), además de inhibir la metástasis de células cancerosas (Park *et al.*, 2001; Kuniyasu *et al.*, 2006). Por otro lado, en estudios realizados *in vitro* se ha observado que el ALC a concentraciones fisiológicas inhibe la proliferación del cáncer en la glándula mamaria (Durgam y Fernandes, 1997; O'sea *et al.*, 1999; Majumder *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006a), pulmón (Shønberg y Krokan, 1995), melanoma (Shultz *et al.*, 1992), colon (Shultz *et al.*, 1992; O'sea *et al.*, 1999; Igarashi y Miyazawa, 2000; Beppu *et al.*, 2006; Kuniyasu *et al.*, 2006), hígado (Igarashi y Miyazawa, 2001), células leucémicas (Agatha *et al.*, 2004) y estómago (Kuniyasu *et al.*, 2006).

Los mecanismos de acción de cómo el ALC reduce o previene el desarrollo de cáncer no son claros, pero con base en los resultados de los diversos estudios realizados, se han

propuesto diferentes mecanismos de su acción anticarcinogénica. Algunos estudios muestran que el efecto inhibitorio del ALC en el crecimiento de células cancerosas (Figura 4) puede ser debido a que actúa como un antioxidante (Ha *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 2000; Figura 5); sin embargo, también se ha observado que el ALC incrementa la peroxidación de los fosfolípidos en las células (Schønberg y Krokan, 1995), por lo que se ha sugerido que el ALC puede estar regulando el crecimiento celular por medio de citotoxicidad o apoptosis de las células cancerosas (Igarashi y Miyazawa, 2000; Ip *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Beppu *et al.*, 2006; Figura 6). Otro posible mecanismo de la actividad anticarcinogénica del ALC es la alteración de la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular (Figuras 7 y 8).

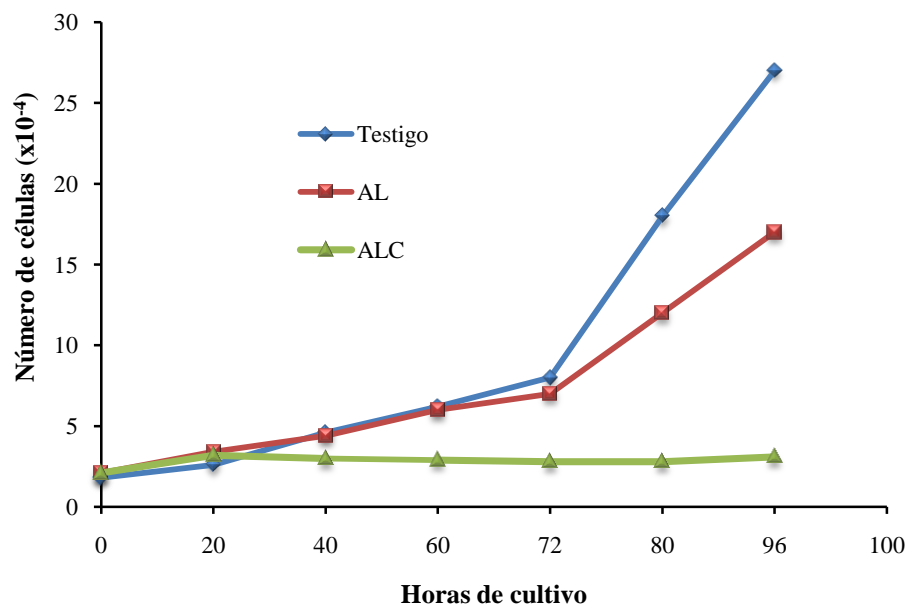


Figura 4. Inhibición del crecimiento de células cancerígenas de la glándula mamaria de ratas, cultivadas por 96 h con 32  $\mu$ M de ALC o AL. Modificado de: Ip *et al.* (2000).

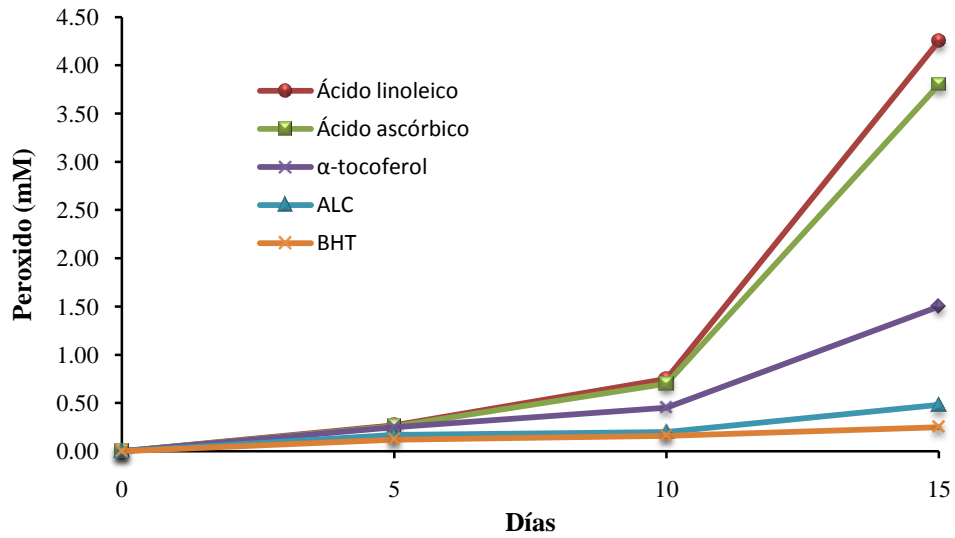


Figura 5. Comparación del ALC con otros antioxidantes. El ácido linoleico (375  $\mu\text{mol}$ ) fue incubado solo o con 0.375  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, ALC o BHT durante 15 días para comparar su actividad antioxidante. Adaptado de: Ha *et al.* (1989).

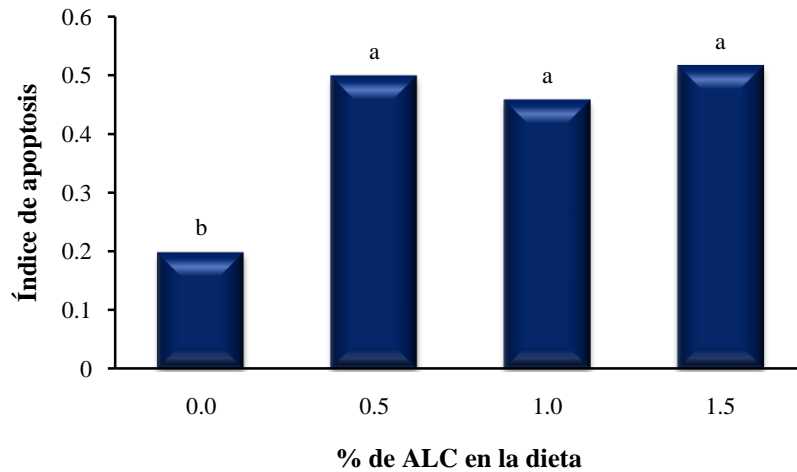


Figura 6. Incremento del índice apoptótico inducido por el ALC en la mucosa del colon de ratas con cáncer inducido. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Adaptado de: Park *et al.* (2001).



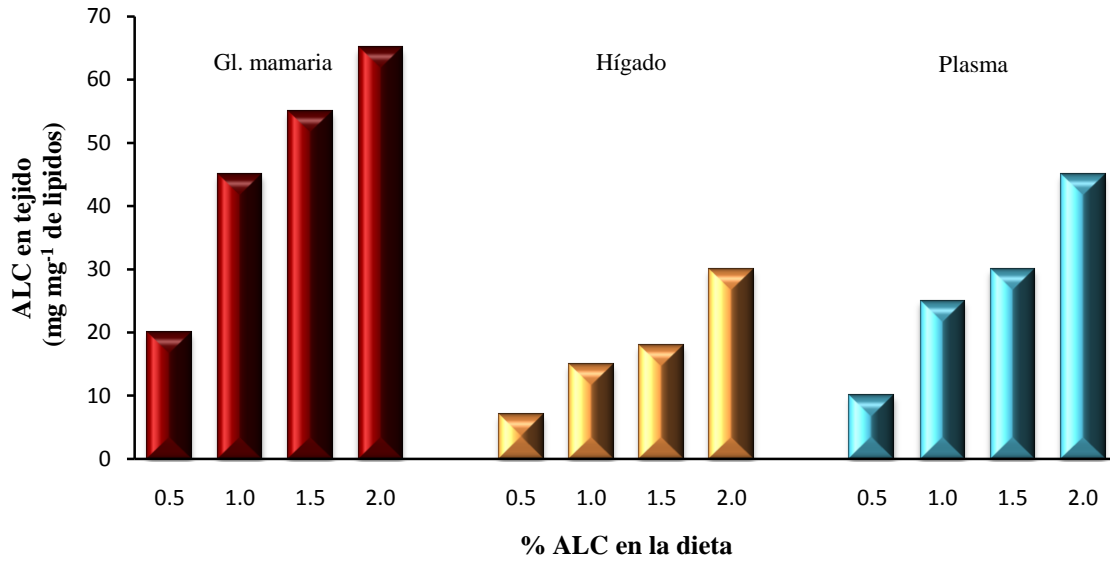


Figura 7. Concentración de ALC en tejidos en función de la concentración del ALC en la dieta. El incremento de la concentración de ALC en tejido de acuerdo a la concentración de ALC en la dieta es estadísticamente significativo ( $P \leq 0.005$ ). No se muestra la concentración de ALC en los diferentes tejidos en el tratamiento sin adición de ALC debido a que la concentración del ALC fue indetectable. Adaptado de: Banni *et al.* (1999).

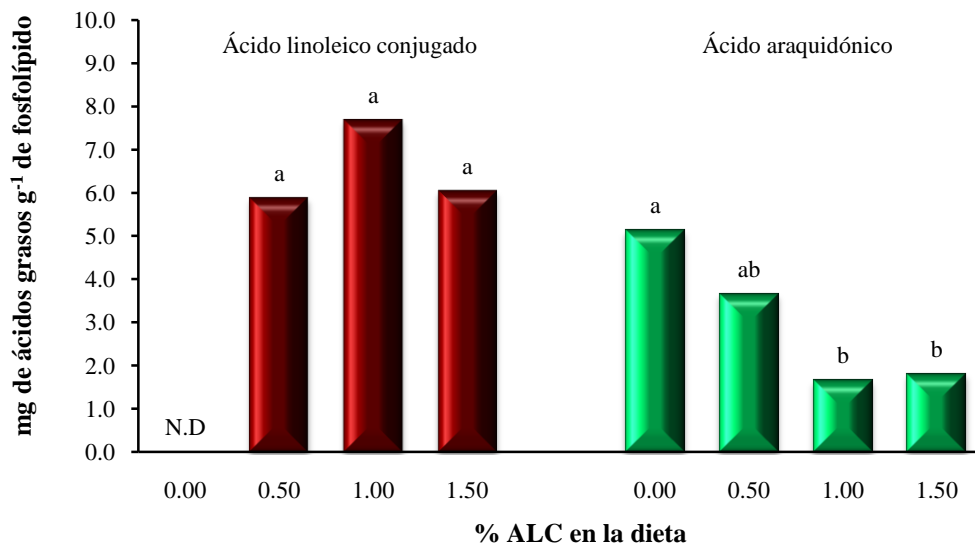


Figura 8. Efecto del ALC en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos de la mucosa del colon de ratas con cáncer inducido. Literales diferentes dentro de cada uno de los ácidos grasos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Park *et al.* (2001).

Hay evidencia de que el ALC inhibe la desaturación del AL y la formación de ácido araquidónico (AA; Figura 9), así como la formación de eicosanoides como la prostaglandina E<sub>2</sub> (Figura 10) a partir del AA, la cual se sabe estimula la proliferación de células cancerosas (Liu y Belury, 1998; Banni *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Agatha *et al.*, 2004); estos cambios causan daños a la célula produciendo su muerte (Park *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha propuesto que el cambio en la composición de los ácidos grasos de la membrana celular afecta negativamente la cantidad y afinidad de los receptores de hormonas que propician la mitogénesis, retardando con ésto el paso de la fase G0 a la G1 (Durgam y Fernandes, 1997) y de la fase G1 a la S del ciclo celular (Kim *et al.*, 2006).

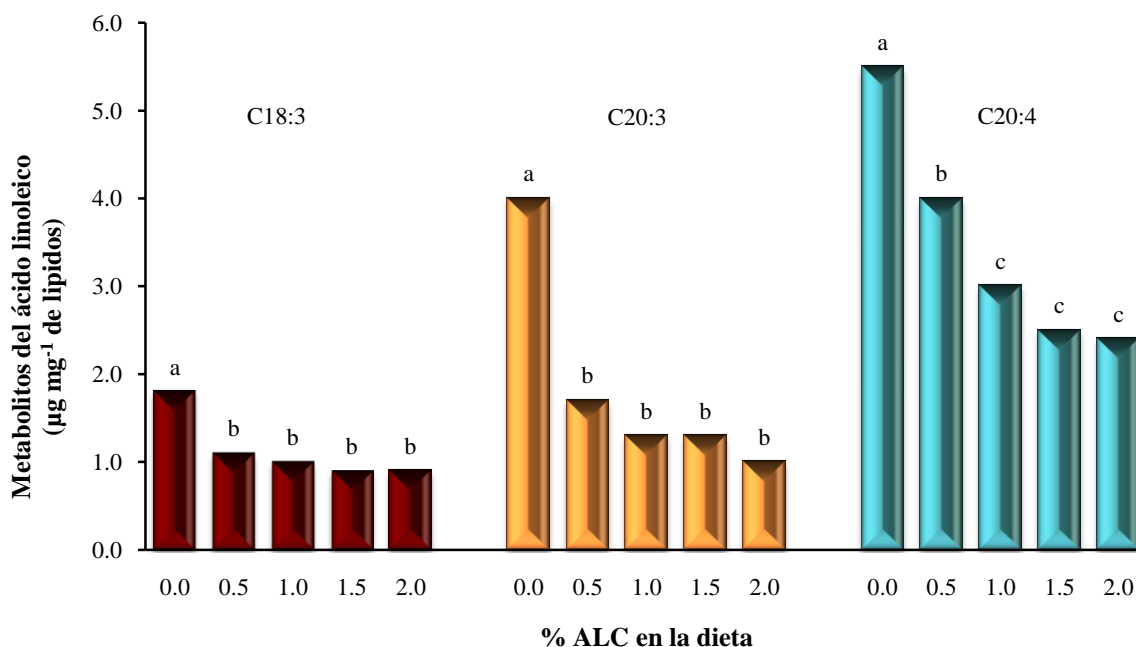


Figura 9. Cambio de los metabolitos del AL en tejido mamario de ratas por efecto del consumo de ALC. Las diferencias ( $P < 0.05$ ) entre grupos están denotadas con diferentes literales por encima de las barras. Adaptado de: Banni *et al.* (1999).

Por otro lado, el grado de inhibición en el crecimiento e incidencia de tumores depende de la concentración del ALC utilizado (Ip *et al.*, 1994; Schønberg y Krokan, 1995; Banni *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Agatha *et al.*, 2004; Kuniyasu *et al.*, 2006) y del tiempo de

exposición (Igarashi y Miyazawa, 2000; Agatha *et al.*, 2004; Beppu *et al.*, 2006), observándose que una adición mayor al 1% de ALC en la dieta no proporciona mayores beneficios (Ip *et al.*, 1996; Banni *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001), independientemente del contenido total de grasa en la dieta (Ip *et al.*, 1996).

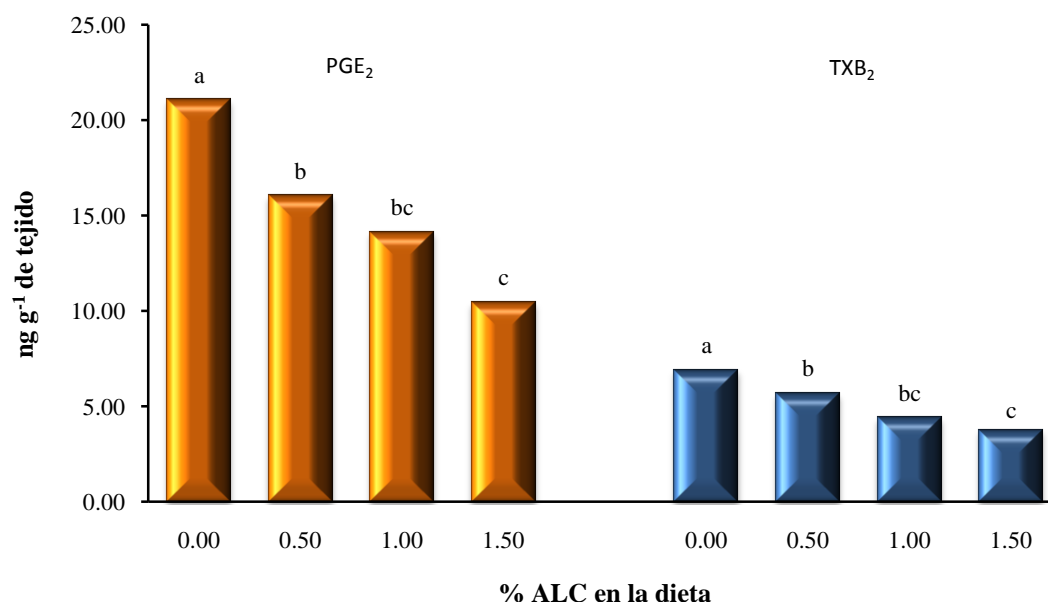


Figura 10. Efecto del ALC en la concentración de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) de la mucosa del colon de ratas con cáncer inducido. Literales diferentes dentro de cada uno de los derivados de los eicosanoides indican diferencias significativas (P<0.05). Adaptado de: Park *et al.* (2001).

También se ha reportado que el ALC puede regular la expresión de algunos genes (Hockenbery *et al.*, 1990; Durgam y Fernandes, 1997), por lo que se ha propuesto que el ALC puede regular la síntesis de algunas proteínas (Shultz *et al.*, 1992; Ip *et al.*, 2001; Kemp *et al.*, 2003). Se ha observado que el ALC dietario reduce la producción de la proteína Bcl-2, la cual es una proteína supresora de la apoptosis; dicha reducción propicia que la proteína Bax (proapoptótica) incremente su actividad y con esto aumenta la apoptosis de las células cancerosas (Figura 11; Belury, 2002; Beppu *et al.*, 2006). Por otro lado, también se ha reportado que la mezcla de ALC (*cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12) o el isómero *trans*10, *cis*12 incrementan la producción de la proteína p53 en mayor medida que sólo el isómero *cis*9,

*trans11* (Kemp *et al.*, 2003). El aumento en la concentración y estabilidad de la proteína supresora de tumores p53 detiene el ciclo celular de las células con ADN dañado e induce su apoptosis de manera más eficiente (Kemp *et al.*, 2003; Figuras 11 y 12).

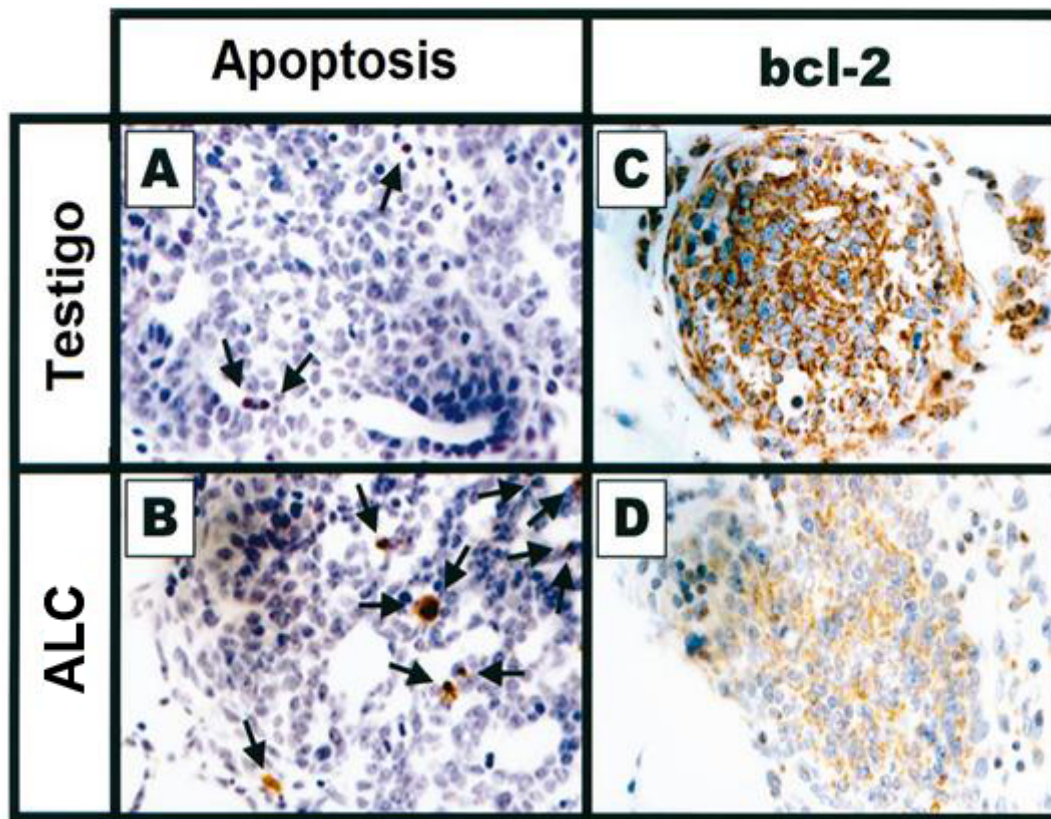


Figura 11. Apoptosis y disminución de la proteína bcl-2 inducida por el ALC en células cancerígenas. Fuente: Ip *et al.* (2000). Reproducido con permiso del editor.

Adicionalmente, el ALC, también reduce los niveles de las ciclinas A y D (proteínas que regulan el paso de la fase G1 a la S del ciclo celular) e incrementa ligeramente los niveles de las proteínas p16, p27 (efecto del isómero *cis9*, *trans11* o mezcla de los isómeros *cis9*, *trans11* y *trans10*, *cis12*; Ip *et al.*, 2000; Ip *et al.* 2001; Belury, 2002; Liu *et al.*, 2002) y p21 (efecto del isómero *trans10*, *cis12*; Kim *et al.*, 2006) inhibiendo con esto la proliferación e incrementando la apoptosis de las células cancerígenas (Figura 12), además de inhibir la activación

carcinogénica (Ha *et al.*, 1987; Liew *et al.*, 1995; Scimeca, 1999) al mantener la proteína c-myc (proteína que regula el crecimiento celular, apoptosis, diferenciación y renovación celular) en niveles normales (Durgam y Fernandes, 1997).

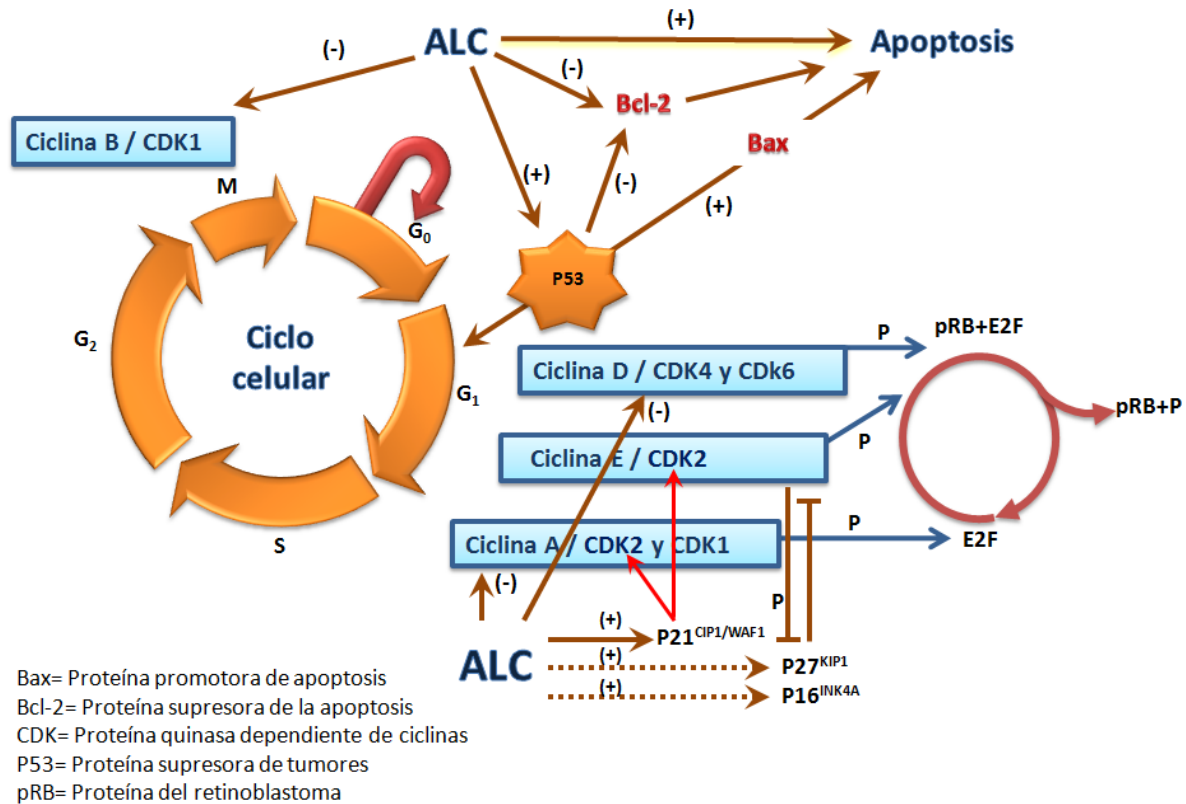


Figura 12. Posible mecanismo de cómo el ALC puede regular el ciclo celular y la apoptosis. El ALC induce apoptosis en las células cancerosas al reducir los niveles de las ciclinas A, B y D. Esta disminución reduce la fosforilación de la pRB, con lo que se mantiene una alta concentración del complejo pRB+E2F, propiciando que la célula se mantenga en arresto en la fase G1. Por otro lado, el incremento en la concentración de las proteínas p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> y p16<sup>INK4A</sup> aumenta la unión de estas proteínas con las CDKs, con lo que se inhibe la actividad de las CDKs, evitando el paso de la fase G0 a la fase G1 y de la fase G1 a fase S del ciclo celular. Además, el ALC disminuye la expresión de la proteína Bcl-2 con lo cual se propicia el incremento de la actividad de la proteína Bax y con esto la apoptosis. El aumento de la proteína p53, también induce supresión de la proteína Bcl-2. Lo anterior junto con el incremento de la proteína Bax aumentan la potencia de la proteína p53 para inducir apoptosis y modular el ciclo celular con mayor eficiencia. Las líneas sólidas (—) indican in efecto significativo (P<0.5), las líneas punteadas (•••) indican un modesto efecto (P<0.5). Modificado de: Belury (2002).

De los isómeros presentes en las mezclas sintéticas de ALC, los isómeros *cis9*, *trans11* y *trans10*, *cis12* son los más abundantes y se sabe que estos dos isómeros tienen diversa actividad biológica. Anteriormente se pensaba que el *cis9*, *trans11* tenía principalmente actividad anticancerígena, mientras que el isómero *trans10*, *cis12* se creía que tenía una mayor actividad sobre la composición corporal (Park *et al.*, 1999a). En la última década se ha observado que el isómero *trans10*, *cis12* tiene un mayor efecto anticarcinogénico que el isómero *cis9*, *trans11* (Yamasaki *et al.*, 2002; Dauchy *et al.*, 2004; Beppu *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha observado que otros isómeros como el *trans9*, *trans11* han mostrado tener una mayor actividad anticarcinogénica que los dos isómeros antes mencionados (Beppu *et al.*, 2006; Figuras 13 y 14).

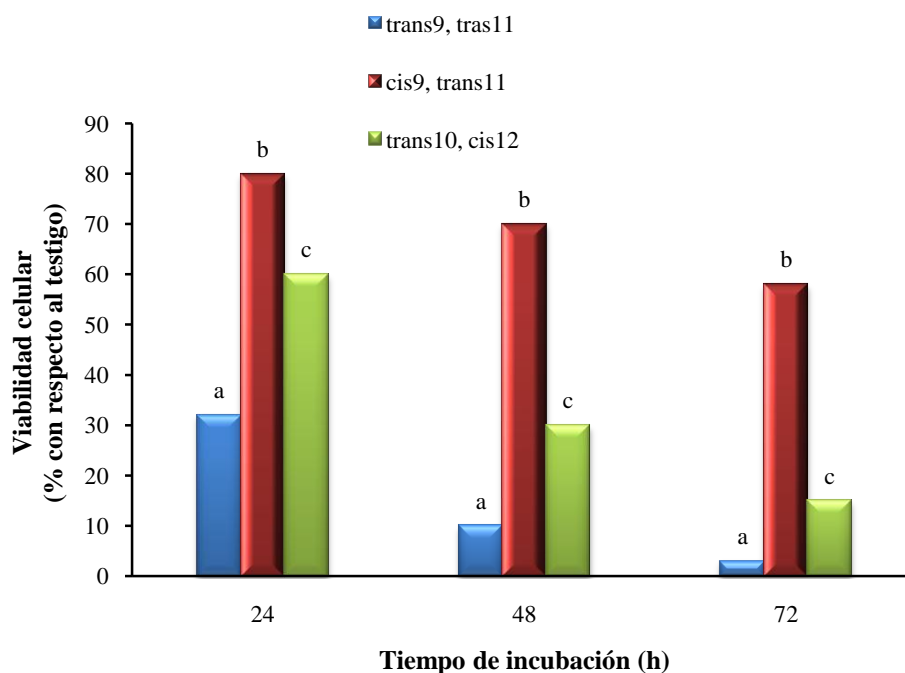


Figura 13. Viabilidad de células cancerígenas de colon incubadas con tres isómeros de ALC (200  $\mu$ M) durante 72 horas. La información de esta gráfica representa la viabilidad celular expresada como un porcentaje del tratamiento testigo, el cual tenía 100% de viabilidad. Barras con diferente literal en el mismo tiempo de incubación indica diferencia estadística ( $P < 0.01$ ). Adaptado de: Beppu *et al.* (2006).

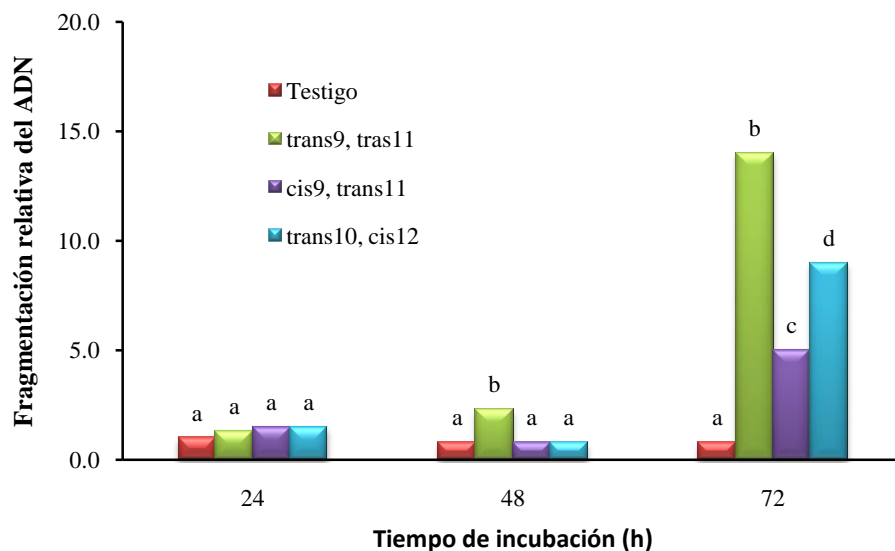


Figura 14. Fragmentación de ADN (apoptosis) en células cancerosas de colon tratadas con tres isómeros de ALC (200  $\mu$ M). La fragmentación relativa fue asignada al tratamiento testigo con un valor de 1. Literales diferentes sobre las columnas en el mismo tiempo de incubación indican diferencia estadística ( $P < 0.01$ ). Adaptado de: Beppu *et al.* (2006).

#### 4.1.2.2. Actividad antiaterogénica

Los cambios que induce el consumo de ALC en los factores de riesgo cardiovascular, tolerancia a la glucosa, niveles sanguíneos de ácidos grasos libres, triglicéridos, lipoproteínas (de alta, HDL; baja, LDL; y muy baja densidad, VLDL), y metabolismo del hígado son controversiales. El consumo de ALC puede afectar el metabolismo del hígado y producir efectos negativos en la homeostasis de la glucosa en roedores (Belury y Kempa-Steczko, 1997). Se ha observado que en ratones, hámsters y pollos, la adición del isómero *trans10*, *cis12* en la dieta incrementa el tamaño del hígado; dicho incremento es resultado de la acumulación de triglicéridos en éste órgano (Belury y Kempa-Steczko, 1997; DeLany *et al.*, 1999; Ohnuki *et al.*, 2001b; Clément *et al.*, 2002; Degrace *et al.*, 2003; Cherian y Goeger, 2004; Poirier *et al.*, 2005a; Arbonés-Mainar *et al.*, 2006b; Kelly *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2006; Churruca *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Wendel *et al.*, 2008; Halade *et*

*al.*, 2010; Figuras 15 y 16). Sin embargo, el consumo del isómero *cis9, trans11*, no produce cambios en el peso del hígado, masa del tejido adiposo (Park *et al.*, 1999a; Degrace *et al.*, 2003), o metabolismo de la glucosa (Risérus *et al.*, 2002a; Wilson *et al.*, 2006).

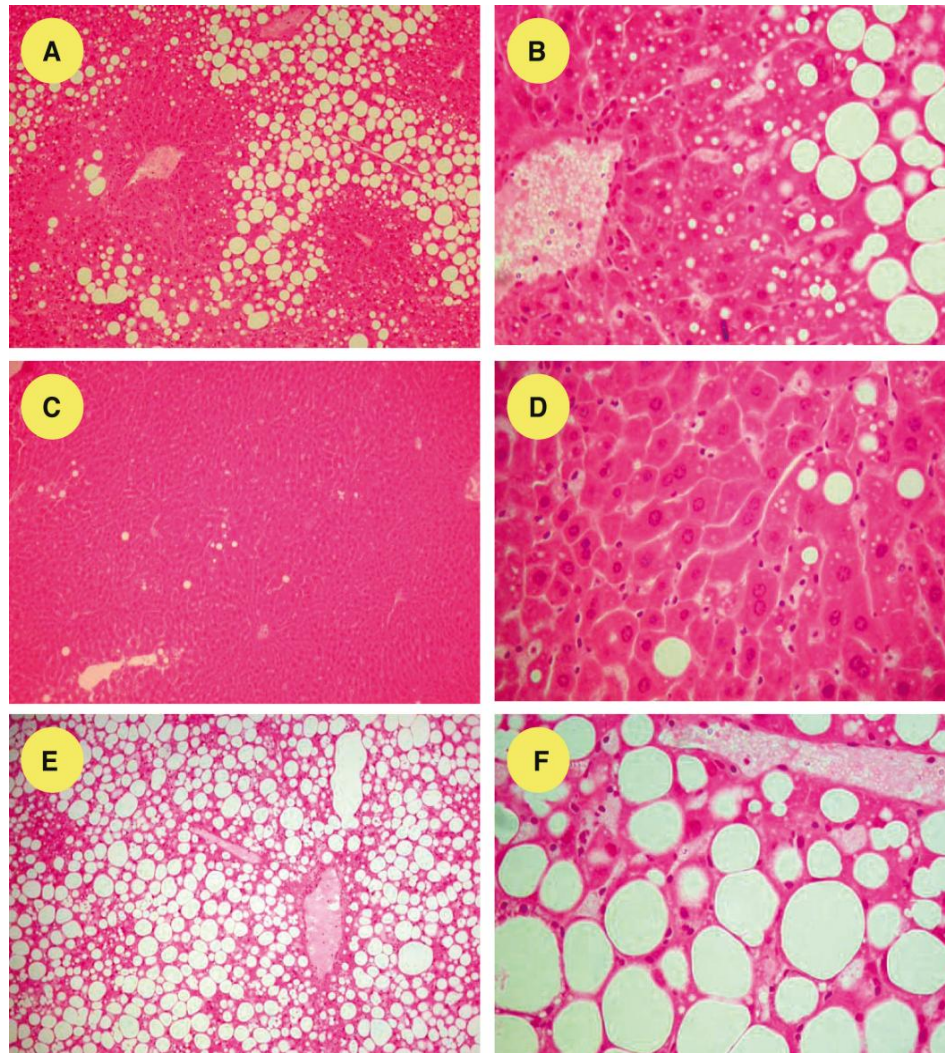


Figura 15. Incidencia de esteatosis hepática en ratones libres de ApoE que fueron alimentados con una dieta testigo (A y B), y dietas adicionadas con el isómero *cis9, trans11* (C y D) e isómero *trans10, cis12* (E y F). Fuente: Arbonés-Mainar *et al.* (2006b). Reproducido con permiso del editor.



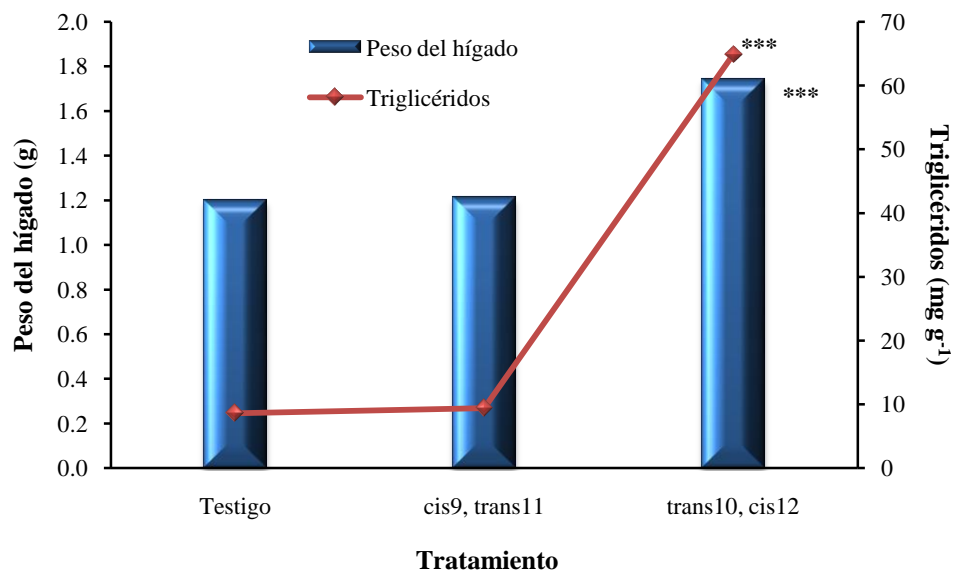


Figura 16. Cambio del peso del hígado y concentración de triglicéridos en hígado de ratones C57Bl/6j alimentados durante cuatro semanas con dos de los principales isómeros del ALC. Los asteriscos indican una diferencia altamente ( $P < 0.001$ ) significativa. Adaptado de: Degrace *et al.* (2003).

La hepatomegalia inducida por el isómero *trans10, cis12*, está caracterizada por una superexpresión de genes involucrados en el almacenamiento del lípidos (PPAR $\gamma$ , ácido graso sintasa, FAT/CD36, aP2; Clément *et al.*, 2002; Degrace *et al.*, 2003; Poirier *et al.*, 2005a), y de las enzimas que sintetizan los triglicéridos (diacilglicerol aciltransferasa; Degrace *et al.*, 2003; Figura 17), lo cual se traduce en un incremento en la síntesis de ácidos grasos y capacidad de esterificación (Degrace *et al.*, 2004).

A pesar de los efectos negativos que produce el consumo del isómero *trans10, cis12*, se ha encontrado que otros isómeros o mezcla de isómeros del ALC tienen efectos positivos en la salud, lo cual ha despertado el interés por utilizarlos. Al alimentar conejos arteroscleróticos (por inducción artificial) con dietas adicionadas con ALC (mezcla de isómeros *cis9, trans11:trans10, cis12*= 1:1) se ha logrado reducir las lesiones arteroscleróticas (Kritchevsky *et al.*, 2000; Kritchevsky *et al.*, 2002; Toomey *et al.*, 2006), a pesar de observar un incremento en el colesterol y una disminución en las lipoproteínas de alta densidad (Kritchevsky *et al.*, 2000) y lipoproteínas de baja densidad (Park *et al.*, 1999a; Storkson *et al.*, 2005).

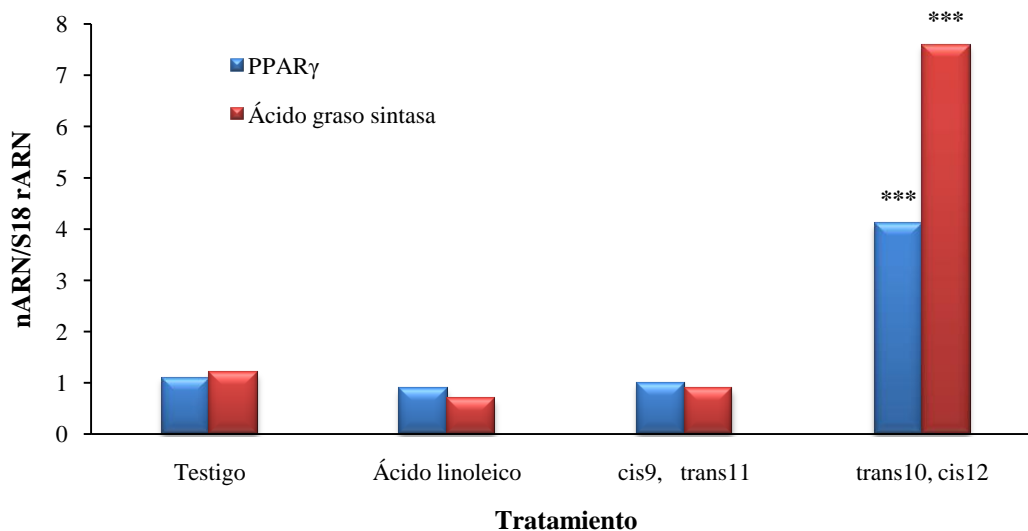


Figura 17. Expresión de genes que codifican la transcripción del PPAR $\gamma$  y ácido graso sintasa en ratones C57Bl/j6 alimentados durante cuatro semanas con dietas que contenían 2% de aceite de girasol (testigo), 2% de aceite de girasol más 0.4% de ácido linoleico, 0.4% del isómero *cis*9, *trans*11 ó 0.4% del isómero *trans*10, *cis*12. Los asteriscos indica diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) con respecto al testigo en cada caso. Modificado de: Clément *et al.* (2002).

En ratones alimentados con dietas aterogénicas, la adición de ALC (2.5 o 5 g kg<sup>-1</sup> PV) reduce la concentración de colesterol total y triglicéridos, e incrementa la concentración de HDL en plasma. Pero, a pesar de propiciar un perfil de lipoproteínas séricas menos aterogénicas, en algunos estudios se ha encontrado que se incrementa la placa aterosclerótica arterial (Munday *et al.*, 1999); mientras que en otros se ha visto que se disminuyen las lesiones ateroscleróticas (Lee *et al.*, 2005; Tommey *et al.*, 2006; Figura 18). Al igual que en conejos, en ratones también se ha reportado que el efecto del ALC depende de la concentración adicionada a la dieta, pues sólo los ratones que consumieron una mayor concentración de ALC en la dieta (5 g kg<sup>-1</sup> de PV) no desarrollaron placa aterosclerótica (Munday *et al.*, 1999). Por otro lado, en cerdos y humanos se ha observado una disminución del colesterol total y de las HDL, y una tendencia a incrementar los ácidos grasos libres (Mougios *et al.*, 2001; Risérus *et al.*, 2002a; Lauridsen *et al.*, 2005).

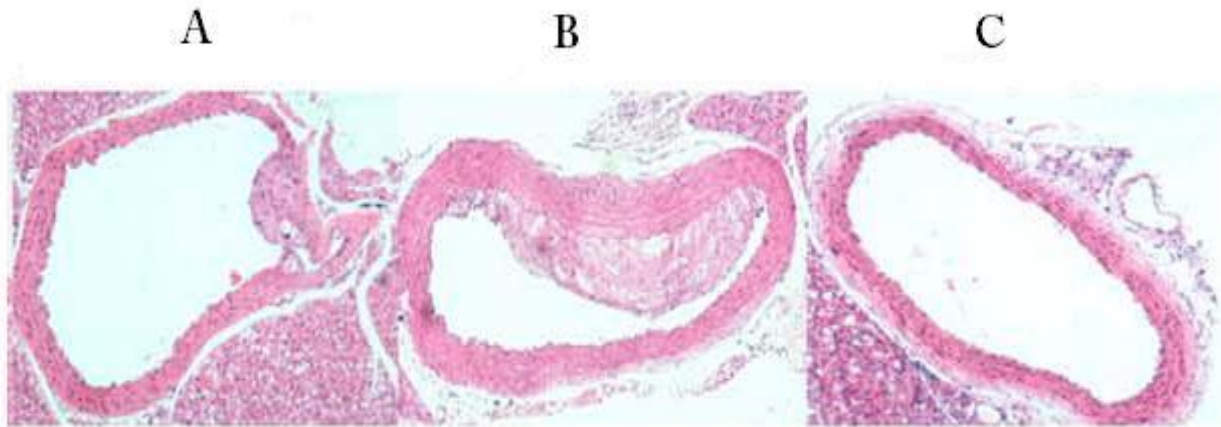


Figura 18. Lesiones ateroscleróticas en aorta de ratones ApoE<sup>-/-</sup>. Los ratones fueron alimentados por 8 semanas con dietas aterogénicas (1% de colesterol), sin adición de ácidos grasos (A), con adición de 1% de grasa saturada (B) ó 1% de ácido linoleico conjugado (*cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12; 0.80:0.20; C). Fuente: Toomey *et al.* (2006). Reproducido con permiso del editor.

Tanto en conejos como en hámsters, la suplementación de ALC (mezcla de los isómeros *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12) a la dieta reduce el colesterol total, las LDL y los triglicéridos, y la formación de la placa aterosclerótica en la aorta (Lee *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998; Gavino *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000; Corino *et al.*, 2002; Valeille *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006). En ratas, se ha encontrado que el consumo de ALC disminuye el colesterol total (Rahman *et al.*, 2001b; Wang *et al.*, 2006b), la concentración de las HDL (Rahman *et al.*, 2001b), VLDL (Rahman *et al.*, 2001a) y triglicéridos (Wang *et al.*, 2006b). En pollos de engorda, el consumo de dietas adicionadas con ALC disminuye la concentración total del colesterol y de las LDL (Simon *et al.*, 2000). En humanos se han encontrado resultados inconsistentes, algunos reportes indican que el consumo de ALC (mezcla de los isómeros *cis*9, *trans*12 y *trans*10, *cis*12) no afecta considerablemente la concentración de colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos (Berven *et al.*, 2000; Benito *et al.*, 2001; Risérus *et al.*, 2001; Smedman y Vessby, 2001; Petridou *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2006); mientras que otros reportan que el ALC puede reducir la concentración del colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos y la relación LDL:HDL (Blankson *et al.*, 2000; Mougios *et al.*, 2001; Noone *et al.*, 2002; Moloney *et al.*, 2004).

Los mecanismos de cómo el ALC disminuye la aterosclerosis no están determinados, pero se cree que es debido en parte a un cambio en el metabolismo de las lipoproteínas (Lee *et al.*, 1994), pues se ha visto que el consumo de ALC disminuye la concentración de las lipoproteínas de baja densidad por medio de la inhibición en la secreción de la apolipoproteína B (Yotsumoto *et al.*, 1999; Benito *et al.*, 2001; Degrace *et al.*, 2003; Figura 19) o por el incremento en la tasa circulatoria de las LDL debido a un aumento en la actividad del receptor para LDL (Grundy y Denke, 1990). También se ha propuesto que la disminución del colesterol sérico se debe parcialmente a que el ALC disminuye la absorción intestinal del colesterol (Yeung *et al.*, 2000).

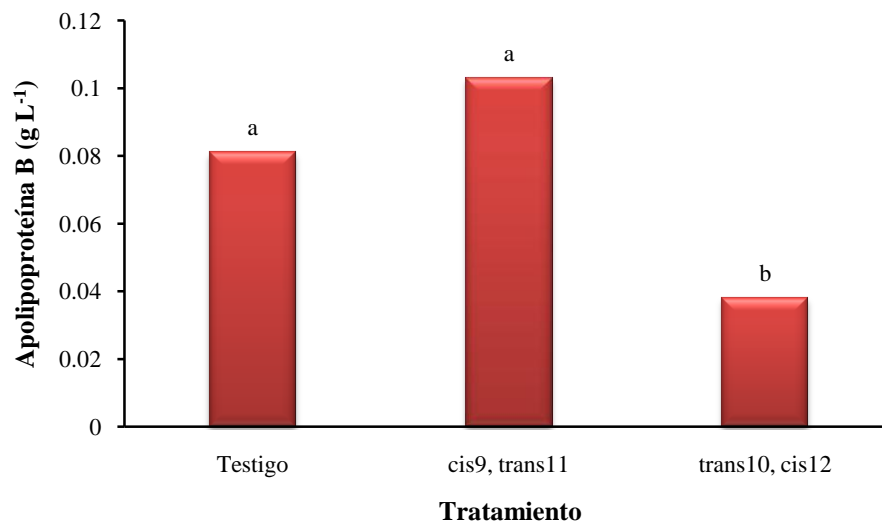


Figura 19. Concentración plasmática de la apolipoproteína B en ratones C57Bl/6j alimentados durante cuatro semanas con alguno de los isómeros del ALC. Diferente literal sobre las columnas indican una diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ). Adaptado de: Degrace *et al.* (2003).

Otro posible mecanismo es que el ALC actúa como un agente antiinflamatorio el cual incrementa la expresión del PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en la aorta, lo cual coincide con una reducción en la acumulación de macrófagos y de la expresión de CD36, y de las citoquinas MMP-9 y PECAM-1, y un incremento en la apoptosis, probablemente de macrófagos (Toomey *et al.*, 2006).

Al analizar el efecto individual de los isómeros *cis9*, *trans11* y *trans10*, *cis12*, se ha encontrado que el isómero *cis9*, *trans11* es el responsable de disminuir el desarrollo de la aterosclerosis en ratones (Degrace *et al.*, 2003; Arbonés-Mainar *et al.*, 2006a) y hámsters (Valeille *et al.*, 2005). En ratones, además de disminuir el colesterol y los ácidos grasos no esterificados (de Roos *et al.*, 2005a; Arbonés-Mainar *et al.*, 2006a), y los triglicéridos (Roche *et al.*, 2002; de Roos *et al.*, 2005a), también incrementa la concentración de la apolipoproteína A-I y disminuye la estabilidad de la placa aterosclerótica (Arbonés-Mainar *et al.*, 2006a). Sin embargo, al alimentar ratones diabéticos con ALC (0.9% en la dieta del isómero *cis9*, *trans11*) sólo se ha observado una disminución en la concentración de triglicéridos plasmáticos, sin disminuir la aterosclerosis (Nestel *et al.*, 2006); mientras que el isómero *trans10*, *cis12* incrementa el colesterol total, las HDL, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados (Akahoshi *et al.*, 2003; de Roos *et al.*, 2005a; Arbonés-Mainar *et al.*, 2006a) y reduce la apolipoproteína A-I, además de que incrementa la lesiones ateroscleróticas en la aorta (de Roos *et al.*, 2005a; Arbonés-Mainar *et al.*, 2006a). Aunque se ha observado un aumento en la concentración de HDL en los animales que consumieron el isómero *trans10*, *cis12*, éstas tienen modificada su composición, ya que en su estructura, en lugar de contener apolipoproteína A-I, contienen la apolipoproteína A-II la cual se ha visto que está positivamente correlacionada ( $r=0.68$ ;  $p<0.001$ ) con la formación de la placa aterosclerótica (Arbonés-Mainar *et al.*, 2006b). Por otro lado, en hámsters se ha encontrado que la adición del isómero *cis9*, *trans11* a la dieta no afecta la concentración de colesterol total, y ninguna de las lipoproteínas en sangre (VLDL, LDL, HDL), pero al adicionar el isómero *trans10*, *cis12* o una mezcla de ALC (isómeros *cis9*, *trans12* y *trans10*, *cis12*) se disminuye la concentración de LDL, HDL (de Deckere *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2006), colesterol total y triglicéridos (Gavino *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2006). Sin embargo, al alimentar a hámsters con dietas aterogénicas adicionadas con el isómero *cis9*, *trans11*, la relación entre las lipoproteínas se ve mejorada (Valeille *et al.*, 2005). En humanos, se ha reportado que el isómero *trans10*, *cis12*, incrementa la concentración de triglicéridos, la relación colesterol total:HDL y LDL:HDL (Tricon *et al.*, 2004a; Thijssen *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en humanos y animales indican que los efectos del ALC sobre los marcadores ateroscleróticos dependen de la especie, estado fisiológico del individuo, concentración y tipo de isómero del ALC usado, y del tiempo de consumo.

#### 4.1.2.3. Actividad antidiabetogénica

La diabetes puede ser causada por insuficiencia en la producción de insulina (tipo 1), por resistencia a la insulina (tipo 2) o por ambas. La diabetes tipo 2, está asociada con la inactividad física, pobre nutrición, y obesidad; está caracterizada por tener alterada la acción de la insulina (resistencia a la insulina), o por tener alterada la función o secreción de insulina de las células  $\beta$  del páncreas. La resistencia a la insulina se desarrolla cuando los tejidos no responden a la concentración normal de insulina presente en la circulación sanguínea. La baja sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina limita la disponibilidad de glucosa para el músculo o tejido graso, por lo que, para mantener la homeostasis de la glucosa, las células  $\beta$  del páncreas responden secretando más insulina, lo cual finalmente resulta en agotamiento, descompensación y falla (Aminot-Gilchrist y Anderson, 2004).

La resistencia a la insulina es una de las principales anormalidades de los individuos con *Diabetes mellitus* tipo 2, y es considerada como el enlace entre la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Wilson *et al.*, 2005). La resistencia a la insulina es uno de los mejores predictores para diagnosticar el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, disfunción endotelial e incremento en el riesgo de trombosis (Fontbonne y Eschwege, 1991). Lo anterior es debido a que los individuos con resistencia a insulina comúnmente presentan concentraciones elevadas de triglicéridos, colesterol, LDL y baja concentración de HDL (Reusch, 2002).

Algunos de los estudios realizados en ratas han reportado que el ALC tiene efectos antidiabéticos (Houseknecht *et al.*, 1998; Ryder *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2002; Akahoshi *et al.*, 2003; Noto *et al.*, 2007), por lo cual se ha especulado que el consumo de ALC pudiera ayudar a prevenir o tratar la diabetes tipo 2 en humanos. Houseknecht *et al.* (1998) encontraron que el ALC (mezcla) normaliza la tolerancia a la glucosa, mejora la hiperinsulinemia y disminuye la circulación de ácidos grasos libres en ratas Zucker prediabéticas. Por otro lado, Ryder *et al.* (2001), usando la misma línea genética de ratas, encontraron que el ALC (mezcla) además de disminuir la grasa corporal, mejoraba la tolerancia a la glucosa; y que esta mejora se debía principalmente a la acción del isómero *trans*10, *cis*12. Además de mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, el

ALC mantiene el tamaño del páncreas y de los islotes sin cambio e incrementa la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4; Noto *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha reportado que el isómero *cis9, trans11* es el responsable de disminuir la concentración de glucosa e incrementar la sensibilidad a la insulina (Akahoshi *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007; Moloney *et al.*, 2007; Figura 20).

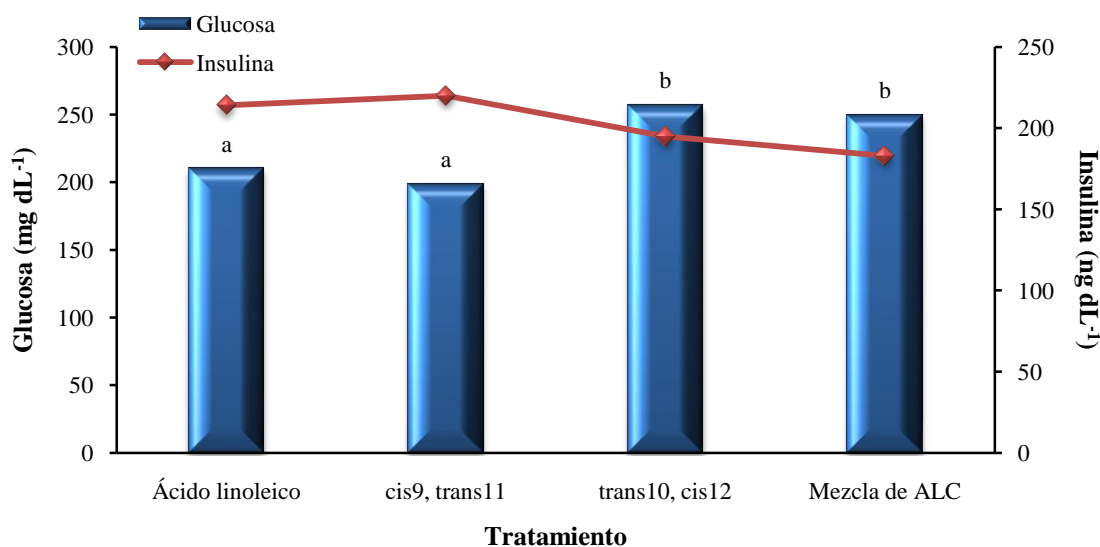


Figura 20. Concentración de glucosa e insulina en suero de ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas adicionadas con ALC. Las dietas fueron adicionadas con 1% de aceite de canola alto en ácido linoleico, ALC ajustado para que proporcionara 0.4% del isómero *cis9, trans11* o *trans10, cis12*, y para que la mezcla de ALC proporcionara 0.35% de cada uno de los isómeros. Literales diferentes en las concentraciones de glucosa o insulina indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Akahoshi *et al.* (2003).

Sin embargo, en estudios realizados con ratones se han encontrado resultados controversiales. Por un lado, se reporta que el ALC (mezcla o el isómero *trans10, cis12*) disminuye la tolerancia a la glucosa y provoca hiperinsulinemia en ratones C57BL/6j (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Clément *et al.*, 2002; Halade *et al.*, 2010) y ratones deficientes de leptina (*ob/ob*; Wargent *et al.*, 2005); por otro lado, se ha observado que el ALC

(mezcla o el isómero *cis9, trans11*) mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones diabéticos (*db/db*; Hamura *et al.*, 2001) y ratones deficientes de leptina (*ob/ob*; Wargent *et al.*, 2005; Moloney *et al.*, 2007). Esta mejora en la tolerancia a la glucosa al parecer es debido a que el isómero *cis9, trans11* incrementa la expresión del transportador GLUT4 (Moloney *et al.*, 2007; Figura 21).

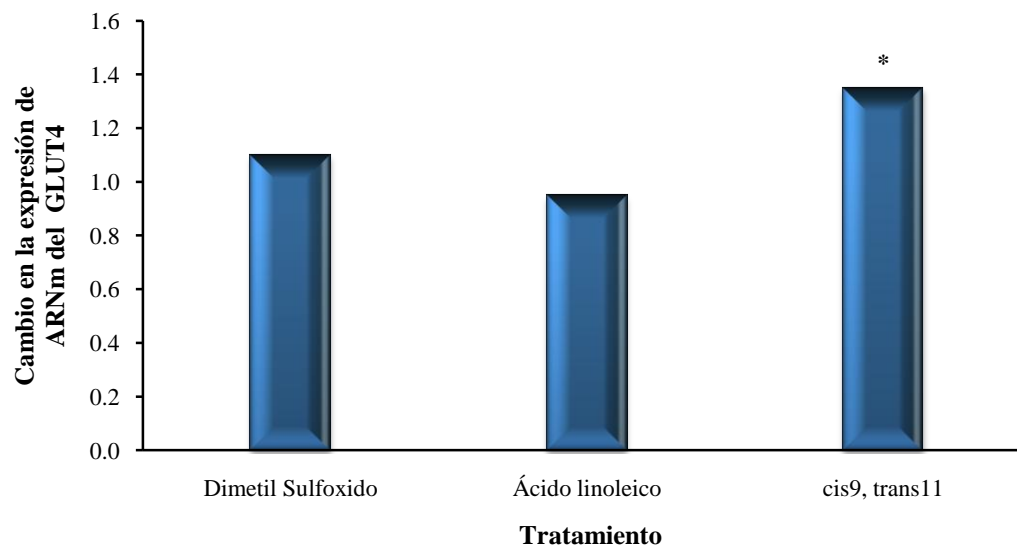


Figura 21. Efecto del isómero *cis9, trans11* en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en adipocitos 3T3-L1. El asterisco indica diferencias significativas entre tratamientos. Modificado de: Moloney *et al.* (2007).

Así como en ratas, en ratones se ha observado que el isómero *cis9, trans11* es el responsable de disminuir la concentración de glucosa e incrementar la sensibilidad a la insulina; mientras que el isómero *trans10, cis12* incrementa la concentración de glucosa, pero no altera la sensibilidad a la insulina (de Roos *et al.*, 2005b; Cuadro 2). Sin embargo, aunque se ha reportado que el isómero *trans10, cis12* aumenta la resistencia a la insulina, se ha observado que este incremento sólo se da en las primeras semanas de suplementación y mejora después de 10 semanas de consumo (Wargent *et al.*, 2005).



Cuadro 2. Concentración de glucosa e insulina en ratones Knockout alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol, adicionada con 1% de ácido linoleico (testigo), 1% del isómero *cis9, trans12*, ó 1% del isómero *trans10, cis12*.

	Testigo	<i>cis9, trans11</i>	<i>trans10, cis12</i>
Glucosa, mmol L <sup>-1</sup>	17.3	14.4*	22.6*
Insulina, pmol L <sup>-1</sup>	295.7	217.8*	304.5

\* indica diferencia estadística (P<0.05) con respecto al testigo. Fuente: de Roos *et al.* (2005b).

Aunque en animales el ALC mejora la sensibilidad a la insulina, en humanos su efecto es controversial. Lo anterior es debido a que en algunos estudios no se ha observado que el consumo de ALC (mezcla) mejore la sensibilidad a la insulina o la concentración de glucosa en sujetos sanos u obesos (Noone *et al.*, 2002; Risérus *et al.*, 2002a; Moloney *et al.*, 2004); sin embargo, se ha encontrado que el isómero *trans10, cis12* disminuye la sensibilidad a la insulina, lo cual resulta en elevadas concentraciones de insulina (Risérus *et al.*, 2002a,b) y glucosa en plasma (Risérus *et al.*, 2002b; Tricon *et al.*, 2004a; Cuadro 3). Por otro lado, se ha encontrado una mejora en la sensibilidad a la insulina en sujetos sedentarios (Eyjolfson *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Cambios en la sensibilidad a la insulina, concentración de insulina y glucosa a partir de las concentraciones basales hasta las 12 semanas de suplementación.

	Testigo	<i>cis9, trans11</i>	<i>trans10, cis12</i>
Sensibilidad a la insulina, mg kg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	0.44	-0.05	-0.55*
Insulina, pmol L <sup>-1</sup>	5.52	4.8	14.4†
Glucosa, mmol L <sup>-1</sup>	-0.14	0.01	0.21‡

\* indica diferencia estadística (P<0.05) con respecto al testigo; † indica diferencia estadística (P<0.05) entre todos los tratamientos; ‡ indica diferencia estadística (P<0.001) con respecto al testigo. Adaptado de: Risérus *et al.* (2002b).

Se cree que uno de los mecanismos por el cual el ALC incrementa la sensibilidad a la insulina es por su capacidad para activar los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ ) y alfa (PPAR $\alpha$ ), los cuales se ha reportado que contribuyen a

aumentar la sensibilidad a la insulina al igual que los sensibilizadores usados clínicamente (Thiazolidinedionas o rosiglitazona; Wargent *et al.*, 2005; Moloney *et al.*, 2007). Pero este efecto también puede ser explicado por otros mecanismos, como la disminución en la infiltración de macrófagos y eliminación del perfil inflamatorio (TNF $\alpha$ , IL6, NF  $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , MCP-1, MIF) en el tejido graso y hepático (de Roos *et al.*, 2005b; Moloney *et al.*, 2007; Halade *et al.*, 2010), los cuales pudieran tener un efecto indirecto, debido a que una proporción de sus efectos antidiabéticos pueden ser atribuidos a su efecto sobre el metabolismo de los lípidos y carbohidratos en el hígado (Evans *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Wargent *et al.*, 2005; Jourdan *et al.*, 2009), incluyendo su efecto sobre la oxidación de los ácidos grasos, lipólisis, lipogénesis *de novo*, y de la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Evans *et al.*, 2002; Akahoshi *et al.*, 2003).

El mecanismo de cómo el ALC induce resistencia a la insulina puede ser explicado por el incremento en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, el tiempo de consumo, y también puede estar ligado a los efectos que ejerce sobre la producción de adiponectinas y citoquinas. El aumento de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos mejora moderadamente la tolerancia a la glucosa (Dumke *et al.*, 2000; de Roos *et al.*, 2005b; Halade *et al.*, 2010). Se ha observado que el ALC incrementa la resistencia a la insulina en sujetos normales, pero la mejora en sujetos obesos. Lo anterior puede ser debido a que al consumir ALC primero se genera resistencia a la insulina seguido por una mejoría en la sensibilidad a esta hormona (O'Hagan y Menzel, 2003; Wargent *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se ha observado que el ALC reduce la actividad y expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4), especialmente por el isómero *trans*10, *cis*12, pero es corregido por el isómero *cis*9, *trans*11 (Takahashi *et al.*, 2002a; Pariza *et al.*, 2003). La disminución del GLUT4 está regulada en parte por el factor nuclear- $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B), y por la proteína cinasa que activa la mitogénesis, o por un mecanismo extracelular que es estimulado por cinasas (Chung *et al.*, 2005). También se ha propuesto que el incremento en la concentración de la insulina en sangre puede deberse a que el ALC induce hiperplasia de las células beta del páncreas (Poirier *et al.*, 2005b).

Por otro lado, se ha propuesto que la leptina puede explicar la diabetes inducida por el ALC (Yamasaki *et al.*, 2000a; Takahashi *et al.*, 2002a; Yamasaki *et al.*, 2003a; Wendel *et al.*, 2008). Lo anterior es debido a que la leptina tiene una función importante en la homeostasis de la glucosa, y su disminución podría modificar la sensibilidad a la insulina (Kamohara *et al.*, 1997; Burcelin *et al.*, 1999; Poirier *et al.*, 2005b; Pérez-Matute *et al.*, 2007), pues se ha visto que los niveles de glucosa disminuyen inmediatamente después de tratar con leptina a ratones *ob/ob* por 4 semanas (Wendel *et al.*, 2008). También se ha reportado que al alimentar ratones con dietas adicionadas con ALC, los niveles de adiponectina y leptina disminuyen drásticamente, incrementándose la reacción inflamatoria, seguida por un aumento en la resistencia a la insulina (Poirier *et al.*, 2005b; Poirier *et al.* 2006). Sin embargo, los resultados son inconsistentes, ya que mientras en estudios realizados en ratones (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Clément *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2002; Poirier *et al.*, 2005b) y humanos (Risérus *et al.*, 2002a,b; Risérus *et al.*, 2003; Risérus, 2006) han encontrado que el ALC induce hiperinsulinemia o resistencia a la insulina, en ratas diabéticas el ALC restablece la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en músculo (Houseknecht *et al.*, 1998; Ryder *et al.*, 2001; Henriksen *et al.*, 2003). Probablemente, en estos últimos casos el efecto antidiabetogénico del isómero *trans*10, *cis*12 primero esté asociado a la disminución de las reservas grasas en el músculo, y posteriormente en mejorar la utilización de la glucosa. En ratas, se ha reportado que el consumo de ALC (mezcla) incrementa la adiponectina y una adipocina (Nagao *et al.*, 2003b). Pero el isómero *cis*9, *trans*11 es el responsable de aumentar la sensibilidad de los receptores 1 (AdipoR-1) y 2 (AdipoR-2) para adiponectina, lo cual resulta en una mayor activación del ligando PPAR $\alpha$  y en la oxidación de los ácidos grasos (Choi *et al.*, 2007). El efecto sobre la sensibilidad a la insulina que tiene la adiponectina está mediado por el incremento en la oxidación de los ácidos grasos, el cual mejora la sensibilidad a la insulina (Nagao *et al.*, 2003b). Por otro lado, en ratones se ha reportado que el consumo del isómero *trans*10, *cis*12 disminuye rápidamente los niveles de adiponectina plasmática lo cual coincide con el desarrollo temprano de la diabetes lipoatrófica (Poirier *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2007). De acuerdo a lo anterior, se puede decir que el isómero *trans*10, *cis*12, puede tener diferentes efectos en la homeostasis de la glucosa dependiendo de la especie o el estado metabólico de los animales (Quignar-Boulangé *et al.*, 2007).

#### 4.1.2.4. Actividad sobre la composición corporal

A finales de los años 90's, Park *et al.* (1997), Park *et al.* (1999b), DeLany y West (2000) y Stangl (2000) observaron que el ALC afecta la acumulación de tejido graso y magro en roedores. Éste efecto fue atribuído al isómero *trans*<sub>10</sub>, *cis*<sub>12</sub> del ALC (Park *et al.*, 1999a; Gavino *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Brandebourg y Hu, 2005; Halade *et al.*, 2010); posteriormente, se encontró que la reducción en la acumulación de tejido graso se debía principalmente a la disminución en el tamaño de los adipocitos (Azain *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004; Corino *et al.*, 2005; Figura 22), y que ese efecto es mayor en hembras que en machos (Azain y Chi, 2001), debido a que disminuye en mayor medida el tamaño de los adipocitos (Corino *et al.*, 2005; Figura 23).

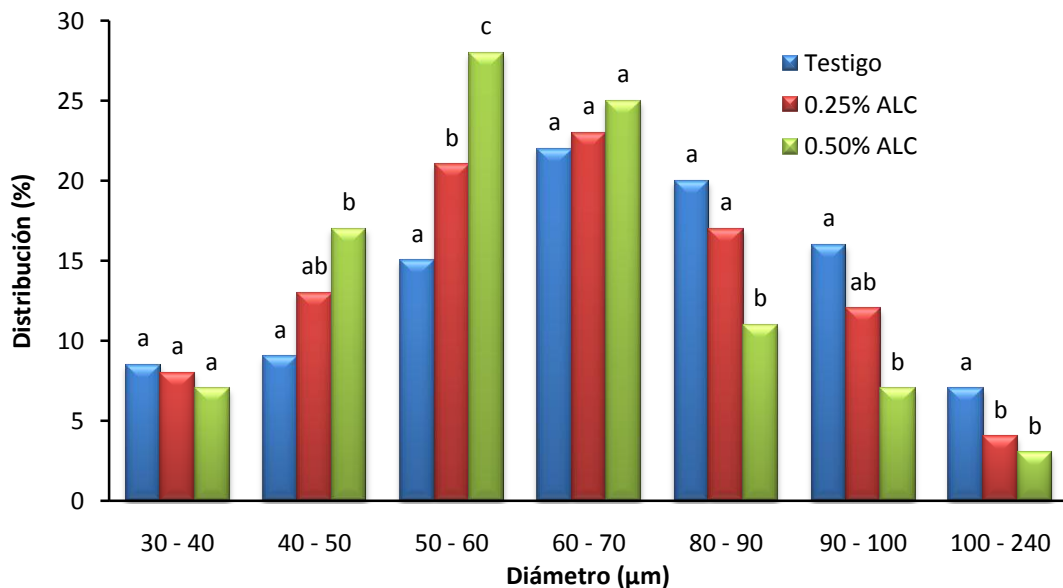


Figura 22. Distribución del tamaño de los adipocitos en la grasa retroperitoneal de ratas alimentadas durante 5 semanas con dietas adicionadas con 0, 0.25 ó 0.50% de ALC. Literales diferentes dentro del mismo rango de tamaño celular indica diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Azain *et al.* (2000).

Al igual que en roedores, los primeros reportes de las investigaciones sobre el efecto del ALC en cerdos se publicaron al final de los años 90's; el objetivo de estos trabajos fue

verificar los resultados obtenidos en roedores, y determinar si el ALC podía de ser usado como un aditivo para disminuir el contenido de grasa e incrementar la cantidad de tejido magro en la canal de los cerdos sin afectar el comportamiento productivo (Dugan *et al.*, 1997; Eggert *et al.*, 1999; Ostrowska *et al.*, 1999; O'Quinn *et al.*, 2000; Eggert *et al.*, 2001).

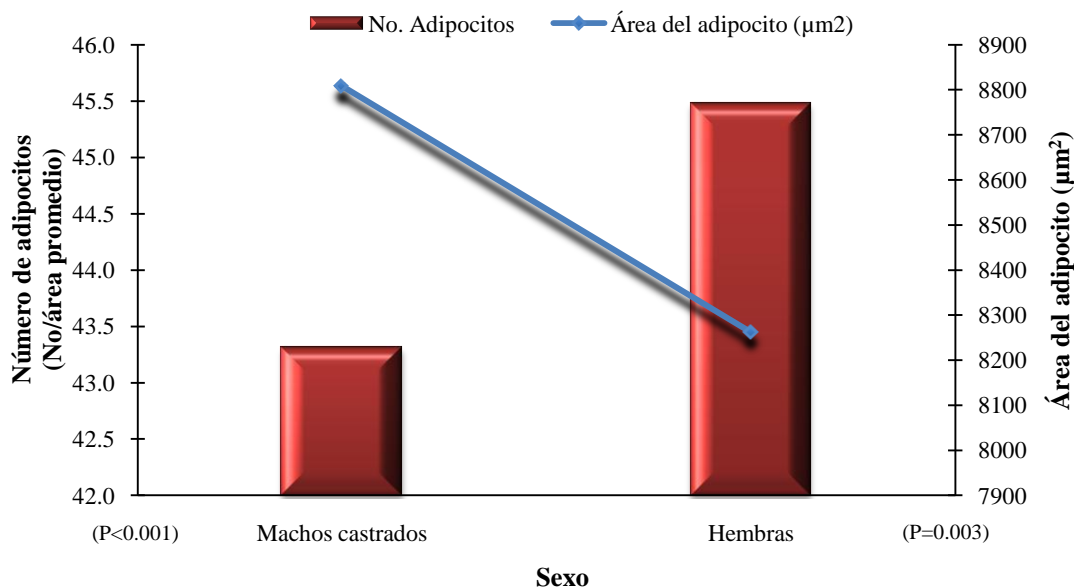


Figura 23. Disminución en el tamaño y número de adipocitos en cerdos alimentados con una dieta con base maíz-cebada-pasta de soja suplementada con 0.75% de ALC. Área promedio = 360,522 µm. Adaptado de: Corino *et al.* (2005).

Los experimentos realizados para determinar el efecto del ALC sobre la composición corporal de los animales han mostrado que el ALC tiene diferente efecto antiadipogénico entre especies y líneas genéticas. Los ratones responden mejor al ALC, ya que con sólo 0.5% de ALC en la dieta se puede reducir entre 40 y 80% el tejido adiposo (Wang y Jones, 2004). Por otro lado, en ratas también se ha observado una disminución en el tejido graso, pero con mayor cantidad de ALC en la dieta y con un menor efecto; pero este efecto sólo se ha observado en ratas en crecimiento (Poulos *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2001a; Mirand *et al.*,

2004). Además, en ratas genéticamente obesas (Zuker) se ha observado que la suplementación con 0.5% de ALC por cinco semanas incrementa el tejido graso (Sisk *et al.*, 2001). En cerdos, se ha observado que efecto del ALC sobre la grasa corporal es menor al observado en roedores; además de obtenerse resultados inconsistentes (Cuadro 4).

Las causas aparentes por las cuales se ha observado variación en el efecto del ALC sobre la grasa de la canal son: 1) La fuente de ALC, 2) Contenido de grasa en la dieta, 3) Sexo, 4) Genética (potencial magro), y 5) Duración y cantidad consumida del ALC (Azain, 2003). Sin embargo, el contenido de grasa en la dieta y la cantidad de grasa de la canal de los cerdos pueden explicar la variación del efecto del consumo de ALC sobre el contenido de grasa en la canal. El ALC disminuye el grosor de la grasa subcutánea cuando a la dieta se le adiciona sólo una pequeña cantidad o nada de grasa, y cuando los cerdos tienen más de 23 mm de espesor de grasa subcutánea (Azain, 2004). Con respecto a las dos afirmaciones anteriores, hay evidencia que muestra que cuando los cerdos son alimentados con dietas adicionadas con ALC y que contienen 2% de grasa total, el grosor de grasa subcutánea disminuye en 11%, mientras que cuando son alimentados con dietas con 5% de grasa total, el efecto del ALC sobre el grosor de la grasa subcutánea no es significativo (Dugan *et al.*, 2001). Con respecto al grosor de la grasa y el sexo de los cerdos, se ha encontrado que en cerdos machos castrados el ALC disminuye en 10.8% el grosor de la grasa dorsal cuando éstos tienen un mayor grosor de grasa (26 mm); mientras que en cerdas (20 mm) el ALC no disminuye la grasa dorsal (Tischendorf *et al.*, 2002a). El efecto del grosor de la grasa dorsal de los cerdos puede confundirse por el efecto del sexo, debido a que generalmente la canal de los machos castrados contiene más grasa que la de las hembras (Azain, 2004). Sin embargo, cuando el grosor de la grasa dorsal es menor en la canal de machos castrados con respecto al de las hembras, el efecto del ALC sobre el grosor de la grasa dorsal es más evidente en las hembras (Corino *et al.*, 2008); es decir, el efecto anti-adipogénico del ALC es mayor en cerdos con más depósitos grasos que en cerdos magros (Azain, 2003) sin importar el sexo (Bee, 2001).

Cuadro 4. Efecto del consumo del ácido linoleico conjugado en la composición de la canal de cerdos y respuesta productiva.

Referencia	Sexo	Peso, kg	Fuente del ALC	Base de la dieta	Cantidad de ALC kg <sup>-1</sup>	Respuesta
Dugan <i>et al.</i> (1997)	Hembras y machos castrados	61 – 106	CLA 50	Trigo-cebada-Pasta de soya – canola, sin adición de grasa	20 g de ALC kg <sup>-1</sup>	7% menos grasa subcutánea, 2% más carne magra, mejor eficiencia alimenticia.
Eggert <i>et al.</i> (1999)	Hembras de dos líneas genéticas diferentes	23 – 46, 68, 91, 114, 136	CLA 60	Maíz-pasta de soya	10 g de ALC vs. 10g de aceite de girasol kg <sup>-1</sup>	Disminución de la grasa dorsal e incremento de contenido magro en la canal por efecto del genotipo.
Ostrowska <i>et al.</i> (1999)	Hembras	57 - 107	CLA 55	Trigo-pasta de soya-chícharo-harina de sangre, con 20% de aceite de soya	0 a 10 g de ALC kg <sup>-1</sup>	20% menos grasa subcutánea, 8% más carne magra, 6% mejor eficiencia alimenticia.
Sparks <i>et al.</i> (1999)	----	287 – 115	CLA 60	-----	12.5 g de ALC kg <sup>-1</sup>	Disminución linear de la grasa dorsal, Incremento cuadrático de la eficiencia alimenticia
O'Quinn <i>et al.</i> (2000)						
	Exp. 1 Machos castrados	38 – 106	Aceite de madera modificado vs. CLA 60	Maíz-pasta de soya, sin adición de grasa	0 vs. 5 g de ALC kg <sup>-1</sup>	Sin cambio en el contenido de grasa.
	Exp. 2 Machos castrados	33 - 119	Aceite de madera modificado	Maíz-pasta de soya, sin adición de grasa	0 a 10 g de aceite de madera modificado kg <sup>-1</sup>	5% menos grasa subcutánea, 1% más tejido magro en la canal.
Bee (2001)	Hembras y machos castrados	70 - 98	SELIN <sup>TM</sup> -CLA (60%)	Trigo-cebada-avena, sin adición de grasa	20 g de manteca de cerdo vs. 20 g ALC kg <sup>-1</sup>	Sin cambio en la cantidad total de grasa de la canal, 21% menos grasa subcutánea a nivel del músculo <i>Longissimus dorsi</i> .

Continuación...

Referencia	Sexo	Peso, kg	Fuente del ALC	Base de la dieta	Cantidad de ALC kg <sup>-1</sup>	Respuesta
Dungan <i>et al.</i> (2001)	Machos castrados	35 – 115	CLA (650 g kg <sup>-1</sup> )	Trigo-cebada-pasta de soya	6 dietas [tres niveles de ALC (0, 2.5 y 5 g kg <sup>-1</sup> ) y dos de grasa total en la dieta (20 y 50 g <sup>-1</sup> )]	6.6% menos grasa subcutánea, mayor incremento de tejido magro en cerdos alimentados con la dieta baja en grasa.
Eggert <i>et al.</i> (2001)	Hembras	75 – 120	CLA 60	Maíz-pasta de soya	10 g aceite de girasol vs. 10 g ALC kg <sup>-1</sup>	Sin cambio en la cantidad de grasa subcutánea.
Ramsay <i>et al.</i> (2001)	Hembras y machos castrados	20 – 55	CLA (670 g kg <sup>-1</sup> )	Maíz-pasta de soya-leche descremada	0, 2.5, 5, 10 y 20 g de ALC kg <sup>-1</sup>	Incremento de la grasa subcutánea con 2.5 y 5 g de ALC kg <sup>-1</sup> .
Thiel-Cooper <i>et al.</i> (2001)	Machos castrados	26 - 114	CLA 60	Maíz-pasta de soya; sin adición de grasa	Cinco dietas (0 – 10 g ALC kg <sup>-1</sup> )	Incremento linear en GDP y eficiencia alimenticia, Disminución cuadrática de la grasa subcutánea.
Tischendorf <i>et al.</i> (2002a)	Hembras y machos castrados	24 – 120	CLA (550 g kg <sup>-1</sup> )	Cebada-pasta de soya	20 g aceite de colza vs. 20 g ALC kg <sup>-1</sup>	Incremento del 2% en el porcentaje de carne magra en la canal; disminución en 11% la grasa dorsal en machos castrados.
Wiegand <i>et al.</i> (2001)	Machos castrados	40 – 106	CLA 60	Maíz-pasta de soya	12.5 g ALC kg <sup>-1</sup>	Disminución de 17% de la grasa dorsal.
Waylan <i>et al.</i> (2002)	Machos castrados	45 – 115	Aceite de madera modificado	Maíz-pasta de soya; sin adición de grasa	0 vs. 5 g de aceite de madera modificado kg <sup>-1</sup>	Disminución en 6% de la grasa subcutánea.
Wiegand <i>et al.</i> (2002)	Machos castrados	20 – 115	CLA 60	Maíz-pasta de soya; sin adición de grasa	0 vs. 7.5 g ALC kg <sup>-1</sup>	14% de disminución en la grasa subcutánea en los días 29 y 56 d y 20% al día 87.



Continuación...

Referencia	Sexo	Peso, kg	Fuente del ALC	Base de la dieta	Cantidad de ALC kg <sup>-1</sup>	Respuesta
Averette-Gatlin <i>et al.</i> (2002)	Hembras	49 – 113	CLA 60	Maíz-pasta de soya; 0 vs 40 g de grasa adicional kg <sup>-1</sup>	0 vs. 10 g ALC kg <sup>-1</sup> de aceite de maíz	Sin cambio en la grasa subcutánea, pero mejoró el marmoleo.
Sun <i>et al.</i> (2004)	Machos castrados	64 – 99	CLA (680 g kg <sup>-1</sup> )	Maíz-pasta de soya-trigo	40 g aceite de soya, 20/20 g aceite de soya/ALC y 40 g ALC kg <sup>-1</sup>	Disminución del consumo de alimento, mejoramiento de la eficiencia alimenticia, 10% menos grasa dorsal.
Lauridsen <i>et al.</i> (2005)	Machos castrados	40 – 100,130	CLA 60	Cebada-trigo-pasta de soya	5 g aceite de girasol vs. 5 g de ALC kg <sup>-1</sup>	Sin efecto sobre la grasa dorsal o calidad de la canal.
Corino <i>et al.</i> (2008)	Hembras y machos castrados	105 – 153	CLA 50	Maíz-cebada-trigo-pasta de soya	0 y 7.5 g kg <sup>-1</sup>	Efecto de sexo en el contenido de tejido magro. Mayor disminución de la grasa dorsal en hembras, debido a su mayor adiposidad comparado con los machos.
Martin <i>et al.</i> (2008b)	Hembras	70 - 107	CLA 60	Cebada-trigo-pasta de soya, con bajo o alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados	0, 10 y 20 g de ALC kg <sup>-1</sup>	Sin efecto sobre la grasa dorsal, pero incremento de la grasa intramuscular.
Intarapichet <i>et al.</i> (2008)	Hembras y machos castrados	60 -	CLA 30	Arroz-pasta de soya-harina de sangre; con 2% de aceite de palma	5 y 20 g de ALC kg <sup>-1</sup>	37% menos grasa en lomo, sin cambio en el jamón.
Larsen <i>et al.</i> (2009)	Machos castrados	55- 113	CLA 60	Maíz-pasta de soya	0 vs. 12.5 g de ALC kg <sup>-1</sup>	Sin cambio en la grasa subcutánea, mejora de la firmeza del tocino.

Además de reducir la acumulación de tejido graso, el ALC también afecta el perfil de ácidos grasos en los diferentes tejidos (Simon *et al.*, 2000; Ramsay *et al.*, 2001; Ostrowska *et al.*, 2003; Cherian y Goeger, 2004; King *et al.*, 2004; Götttsche y Straarup, 2006; Kelly *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2009). El consumo de ALC incrementa la cantidad de ácido palmítico, esteárico y palmitoleico, y disminuye la concentración de ácido araquidónico, ácido linoleico y ácido oleico en la grasa (Sugano *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2000; Wiegand *et al.*, 2002; Ostrowska *et al.*, 2003; King *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2006; Intarapichet *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2009), cambiando con esto la composición del perfil de ácidos grasos hacia un perfil de ácidos grasos más saturados (Kramer *et al.*, 1998; O'Quinn *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2000; Eggert *et al.*, 2001; Ramsay *et al.*, 2001; Thiel-Cooper *et al.*, 2001; Szymczyk *et al.*, 2001; Cherain *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Tischendorf *et al.*, 2002b; Mir *et al.*, 2003; Ostrowska *et al.*, 2003; Cherian y Goeger, 2004; Sun *et al.*, 2004; Dunshea *et al.*, 2005; Lauridsen *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2009). Generalmente la incorporación de ALC es mayor en tejidos con alto contenido de lípidos neutros (triglicéridos) que en fosfolípidos (Kramer *et al.*, 1998; Santora *et al.*, 2000; Götttsche y Straarup, 2006; Kelly *et al.*, 2006; Lund *et al.*, 2006); es decir, es más difícil que el ALC se incorpore en órganos con alta proporción de fosfolípidos como el bazo ó hígado (Kelly *et al.*, 2006).

Los mecanismos por los cuales el ALC regula la composición corporal no están bien determinados, pero se ha visto que el ALC (mezcla de isómeros de ALC (*cis*-9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12) y el isómero *trans*10, *cis*12) puede regular el metabolismo del tejido adiposo al inhibir su formación por el bloqueo de las enzimas responsables de la acumulación de lípidos, como son: la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Brodie *et al.*, 1999; Brandebourg y Hu, 2005), la ácido graso sintasa, la acetil-CoA carboxilasa (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Corino *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2007; Corl *et al.*, 2008), la esteroil-CoA desaturasa 1 (Lee *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002), la lipoproteína lipasa (Park *et al.*, 1997; McNeel y Mersmann, 2003; Xu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Corl *et al.*, 2008), y la fosfatidato fosfohidrolasa (Rahman *et al.*, 2001b), además de incrementar la lipólisis; este aumento puede ser explicado por una mayor actividad de la enzima carnitina-palmitoiltransferasa en el tejido graso y músculo esquelético (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999b; Martin *et al.*, 2000; Whigham *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2001a; Rahman *et al.*,

2001b; Wang *et al.*, 2006b), haciendo que haya mayor disponibilidad de energía (West *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000; Ohnishi *et al.*, 2001a,b; Trepstra *et al.*, 2002; Wahle *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2007; Park y Pariza, 2007). También se ha propuesto que el isómero *trans*10, *cis*12, al disminuir la expresión de la lipoproteína lipasa disminuye el ingreso y utilización de los ácidos grasos exógenos y glucosa en los preadipocitos, limitando con esto el sustrato para sintetizar y acumular triglicéridos (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999a; Evans *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001; Brown y McIntosh, 2003; Figura 24).

Por otro lado, se ha visto que el isómero *trans*10, *cis*12 inhibe en forma dependiente a su concentración, la proliferación y diferenciación de los preadipocitos mediante un mecanismo que disminuye la expresión del PPAR $\gamma$  (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Brandebourg y Hu, 2005) de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c; Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Roche *et al.*, 2002; Brandebourg y Hu, 2005), de la proteína alfa unida a incrementadores CCAAT (C/EBP $\alpha$ ) y de la proteína de unión de los ácidos grasos (a2P; Brodie *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2001; Clément *et al.*, 2002; McNeel y Mersmann, 2003), los cuales también son necesarios en la adipogénesis (Brodie *et al.*, 1999; Brandebourg y Hu, 2005). Además, se ha reportado que el ALC (mezcla de *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12 o solo el isómero *trans*10, *cis*12) induce apoptosis en el tejido adiposo, con lo cual se reduce la masa y número de los preadipocitos y adipocitos (Brodie *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2000; Miner *et al.*, 2001; Corino *et al.*, 2005; Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007; Figura 25). Dicha apoptosis puede ser explicada por el incremento en la fragmentación del ADN (Hargrave *et al.*, 2004), probablemente debida al aumento en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la proteína desacopladora 2 (UCP2; Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Ryder *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2006b).

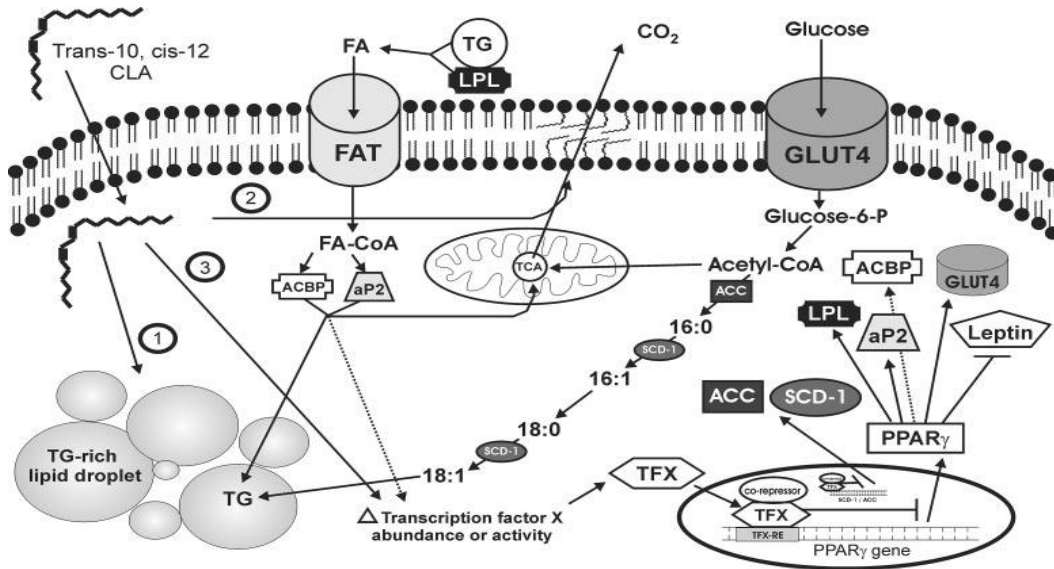


Figura 24. Posibles mecanismos por los cuales el isómero *trans*10, *cis*12 puede disminuir la acumulación de triglicéridos en los (pre)adipocitos diferenciados. El ALC ingresa a la célula por un mecanismo de transporte desconocido. Mecanismo 1: el ALC puede ser esterificado en las gotas de lípidos ricos en triglicéridos, en donde probablemente tiene una pequeña función reguladora y pudiera potencialmente incrementar la acumulación de triglicéridos. Mecanismo 2: el ALC puede esterificarse en la doble membrana de fosfolípidos en donde pudieran afectar la fluidez de la membrana y las cascadas de señales de transducción asociadas a la membrana. Mecanismo 3: el ALC puede alterar la abundancia o actividad de un factor de transcripción no identificado (TFX), lo cual resulta en una represión transcripcional del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) y regulación a la baja de la lipasa lipoproteica (LPL), proteína unidora del acil-CoA (ACBP), proteína unidora de los ácidos grasos del adipocito (aP2), el transportador de glucosa 4 (GLUT4) estimulado por insulina y leptina. Además de la alteración de la actividad o abundancia del TFX, el ALC disminuye la expresión de la esteroil-CoA desaturasa (SCD-1), y la acetil-CoA carboxilasa (ACC), lo cual posiblemente es independiente de la habilidad del ALC para disminuir las señales del PPAR $\gamma$ . Por la regulación a la baja del GLUT4, ACC y SCD-1, el ALC disminuye la captación de glucosa por estimulación de la insulina, síntesis de la malonil-CoA, y la síntesis de oleato, respectivamente, disminuyendo colectivamente la síntesis *de novo* de ácidos grasos. La disminución del malonil-CoA podría perjudicar la elongación de los ácidos grasos (AG) a ácidos grasos insaturados de cadena larga, limitando su disponibilidad para la producción de eicosanoides y la señalización celular, incluyendo la activación del PPAR $\gamma$ . La regulación a la baja de LPL, ACBP, y aP2 disminuye la captación de AG y altera su circulación intracelular para disminuir su esterificación a triglicéridos. Alternativamente, el ALC provoca alteraciones en el metabolismo de los AG pudiendo disminuir la síntesis de ligandos endógenos (eicosanoides) por el TFX o el PPAR $\gamma$ . Fuente: Brown y McIntosh (2003). Reproducido con permiso del editor.

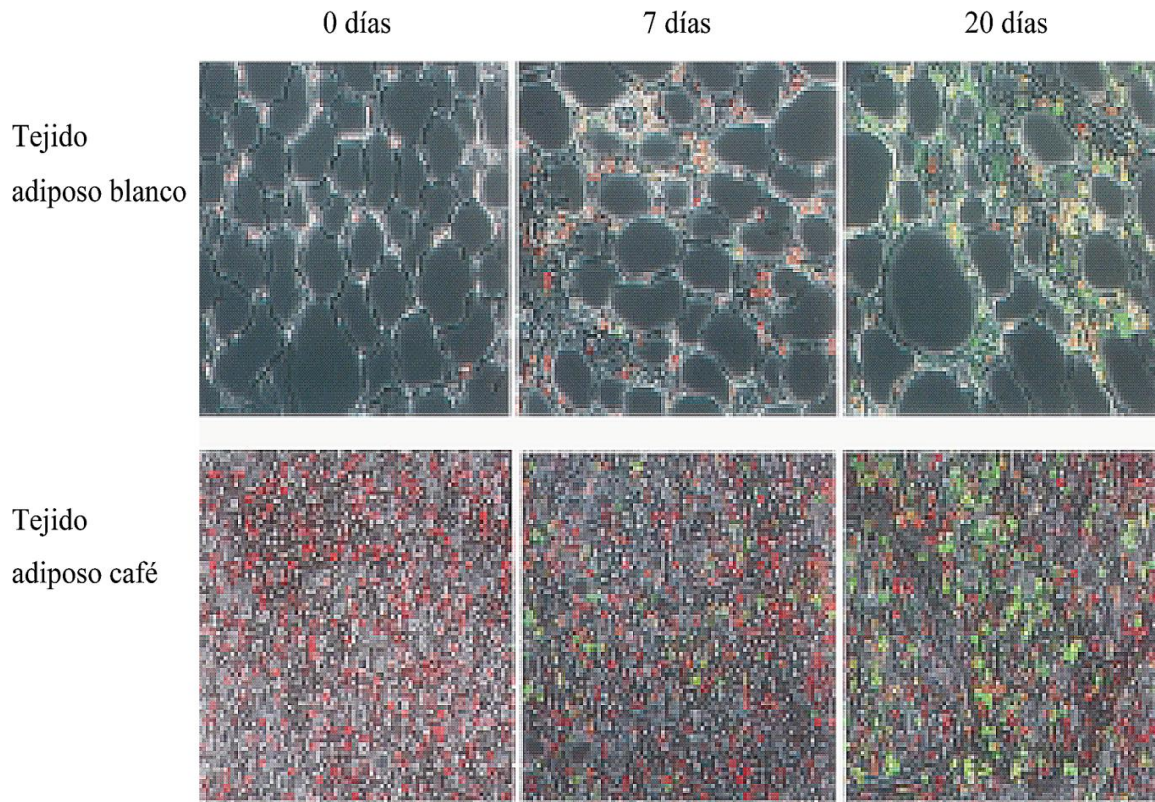


Figura 25. Apoptosis inducida por el consumo de ALC en tejido adiposo. Los núcleos están teñidos de rojo, los núcleos apoptóticos están teñidos de verde. Estas microfotografías son representaciones de tejido adiposo blanco y tejido adiposo café. Fuente: Tsuboyama-Kasaoka *et al.* (2000). Reproducido con permiso del editor.

Adicionalmente, se ha visto que el isómero *trans*10, *cis*12 induce parcialmente lipólisis por la supresión en la expresión de la perilipina (proteína presente en las gotas lipídicas que ayuda a movilizar y acumular lípidos) disminuyendo con esto el almacenamiento de triglicéridos. La eliminación de la perilipina reduce la masa grasa, incrementa la lipólisis basal, y altera la morfología de las gotas lipídicas (Figura 26), lo que termina en una disminución del tamaño de los adipocitos (Chung *et al.*, 2005; Figura 27).

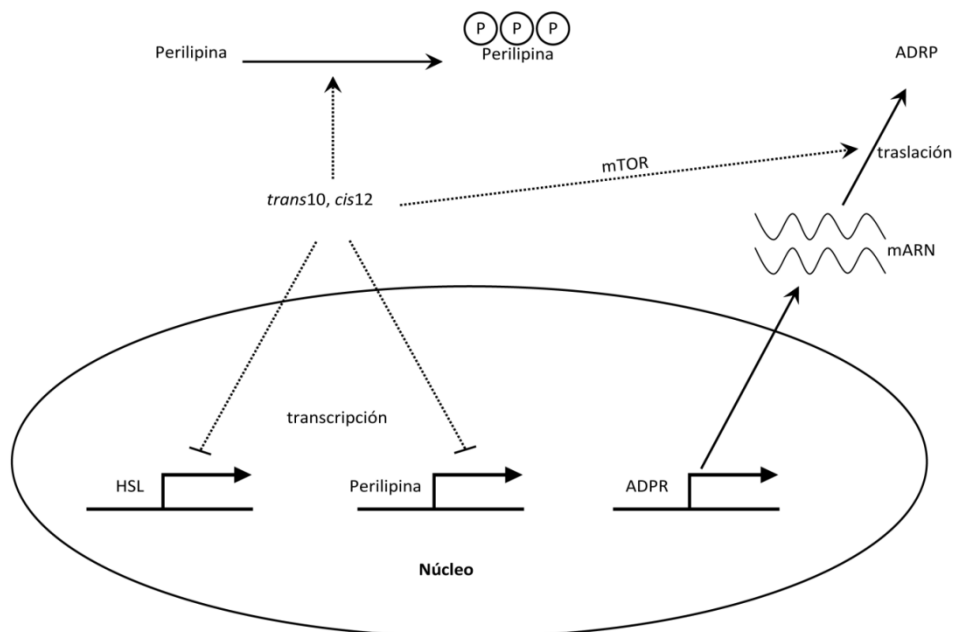


Figura 26. Cambios morfológicos inducidos por el isómero *trans10, cis12* en los adipocitos, por medio de la regulación a nivel transcripcional, traslacional y postranscripcional de las proteínas asociadas a las gotas lipídicas. En condiciones normales (no lipolíticas) la perilipina se expresa exclusivamente en los adipocitos maduros, y sirve como barrera para proteger a las gotas lipídicas de la hidrólisis producida por la lipasa sensible a hormonas (HSL). La suplementación prolongada con el isómero *trans10, cis12* cambia la morfología del adipocito al promover el desarrollo de numerosas gotas lipídicas pequeñas cubiertas con la proteína relacionada con la diferenciación del adipocito (ADRP). El isómero *trans10, cis12* induce la fosforilación de la perilipina, lo cual provoca el movimiento de la perilipina de la superficie de las gotas lipídicas al citosol y así se incrementa la susceptibilidad a la hidrólisis por la lipasa(s), resultando en un incremento en la lipólisis basal. El remplazo de la perilipina por la ADRP como proteína que cubre a las gotas lipídicas por efecto del ALC, es resultado de la acción combinada de la represión a nivel transcripcional de la perilipina y de la HSL, y la activación traslacional de la ADRP en una forma dependiente del blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR). Fuente: Chung *et al.* (2005). Reproducido con permiso del editor.

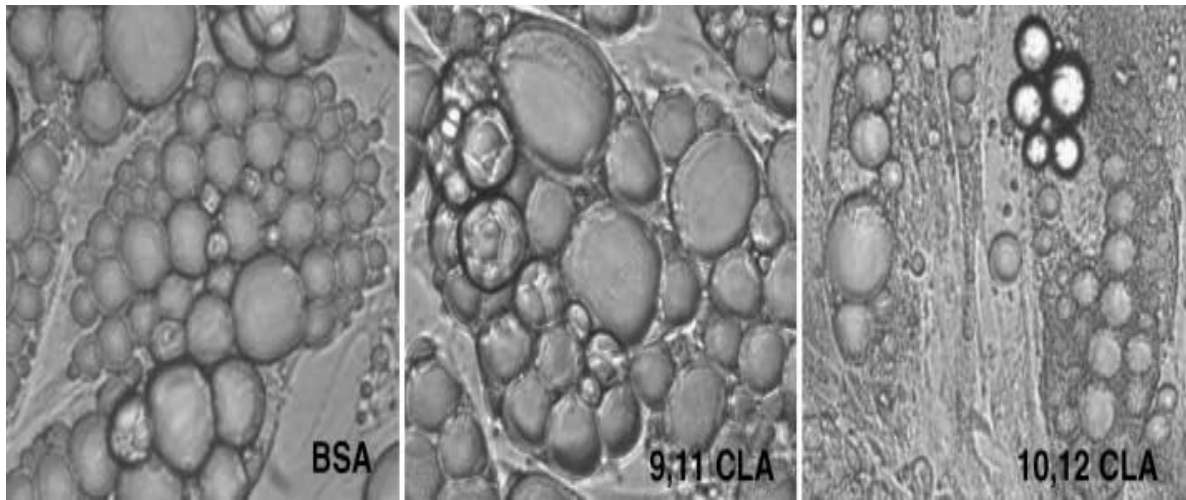


Figura 27. Alteración de la morfología de las gotas lipídicas por el isómero *trans*10, *cis*12. Adipocitos del estroma vascular recién diferenciados tratados por 7 días con BSA, 30  $\mu$ M del isómero *cis*9, *trans*11 o 30  $\mu$ M del isómero *trans*10, *cis*12. Fuente: Chung *et al.* (2005). Reproducido con permiso del editor.

También se ha propuesto que el ALC, por medio de las adipoquinas y citoquinas regula la reducción de la grasa corporal (Park y Pariza, 2007), pues se ha observado que el ALC reduce la secreción de leptina en tejido adiposo (Yamasaki *et al.*, 2000a; Kang y Pariza, 2001; Takahashi *et al.*, 2002a; Figura 28), y su concentración en suero o plasma sanguíneo (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2000a; Rahman *et al.*, 2001a; Ryder *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2007; Botelho *et al.*, 2008; Halade *et al.*, 2010; Figura 29).

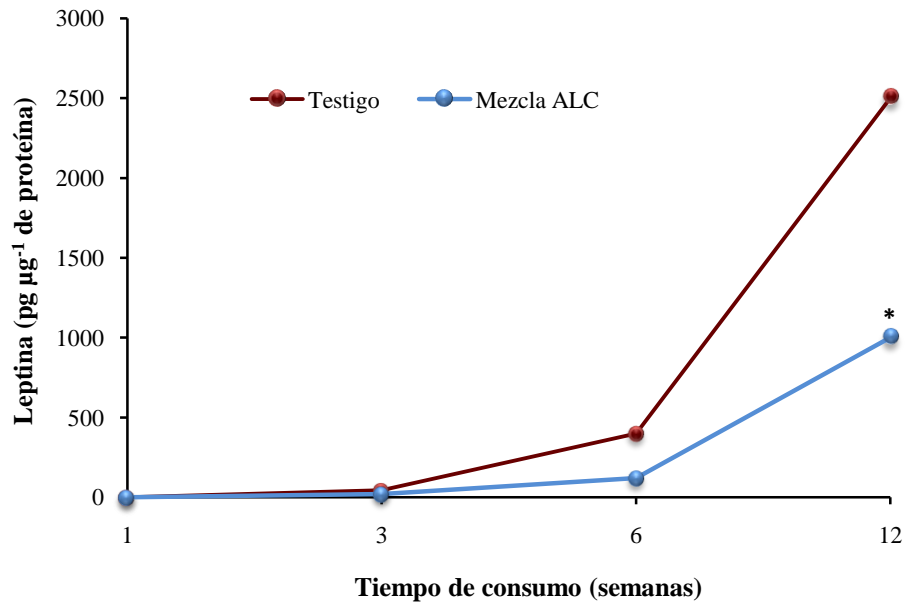


Figura 28. Reducción en la concentración de la leptina por efecto del consumo de ALC (mezcla de isómeros *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12) en tejido adiposo perirenal de ratas. La concentración de leptina entre el testigo y el ALC fueron diferentes en todas las semanas de alimentación ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Yamasaki *et al.* (2000a).

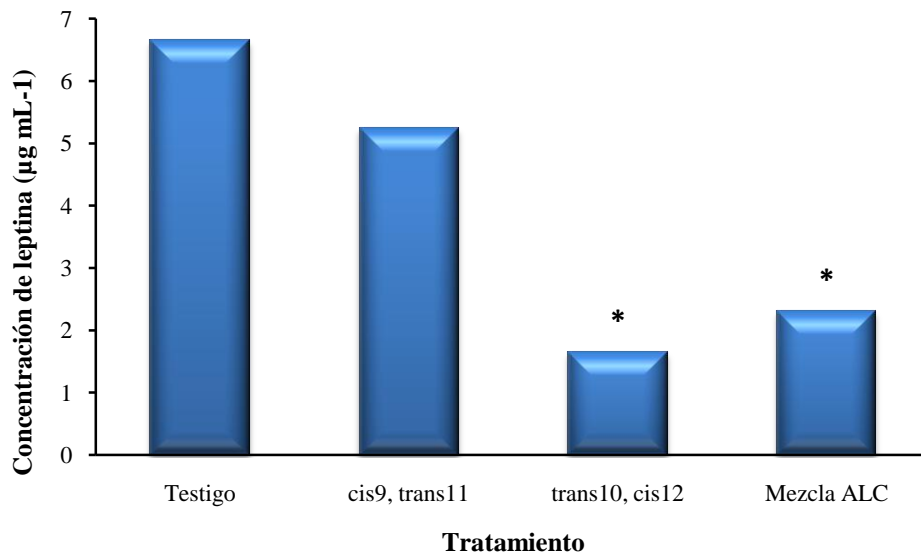


Figura 29. Concentración de leptina en plasma sanguíneo de ratones C57B/6j que consumieron ALC durante 6 meses. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al tratamiento testigo y al tratamiento *cis*9, *trans*11. Adaptado de: Halade *et al.* (2010).



Aunque la reducción de la leptina inducida por el ALC puede explicar la disminución total del tejido adiposo, la pérdida de los efectos de la leptina por su baja concentración es cuestionable. También se ha observado que el consumo de ALC incrementa la secreción de adiponectina y reduce el TNF $\alpha$  (Pariza *et al.*, 2000; Roche *et al.*, 2002; Nagao *et al.*, 2003b; Yang y Cook, 2003; Yamasaki *et al.*, 2003a; Inoue *et al.*, 2004; Moloney *et al.*, 2007; Halade *et al.*, 2010; Figuras 30 y 31); estos efectos pueden ayudar a mejorar la sensibilidad a la insulina y reducir muchas patologías crónicas.

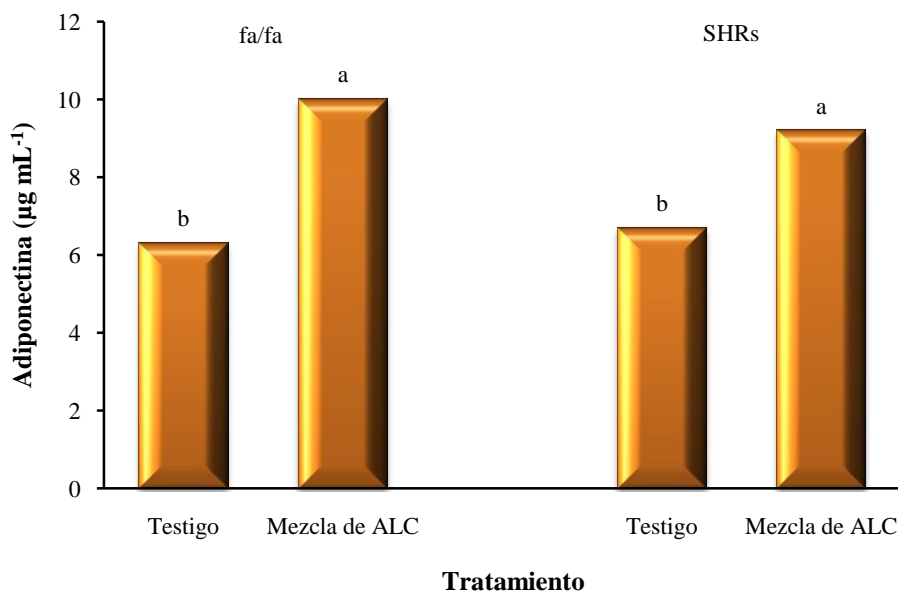


Figura 30. Concentración plasmática de adiponectina en ratas Zucker diabéticas obesas (fa/fa) y ratas con hipertensión espontánea (SHRs). Las ratas fa/fa fueron alimentadas durante 8 semanas con una dieta testigo o ALC. Las ratas SHRs fueron alimentadas por 4 semanas con una dieta testigo o ALC. Diferentes literales en cada uno de los grupos de ratas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Nagao *et al.* (2003b) y Inoue *et al.* (2004).

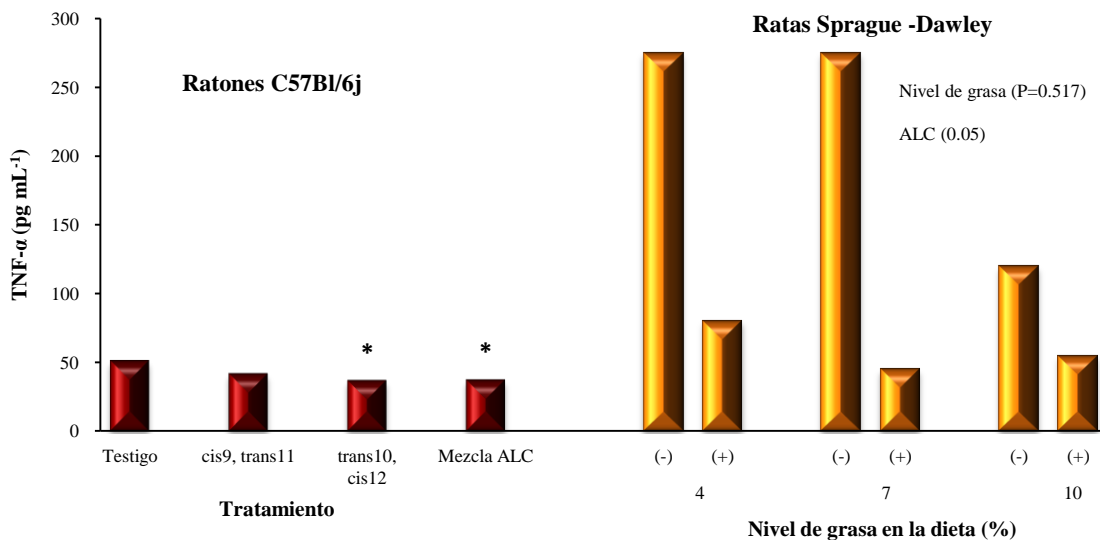


Figura 31. Efecto del ALC en la concentración plasmática de TNF- $\alpha$  en ratones C57Bl/6j y ratas Sprague-Dawley. Los ratones fueron alimentados durante seis meses con algunos de los isómeros del ALC. Las ratas fueron alimentadas durante tres semanas con dietas con diferentes niveles de grasa con o sin la adición de ALC (mezcla de los isómeros *cis9*, *trans11* y *trans10*, *cis12*). En el caso de los ratones los asteriscos indican diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) comparadas con el tratamiento testigo y el tratamiento con *cis9*, *trans11*. En las ratas sólo se encontraron diferencias debidas a la adición de ALC ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Halade *et al.* (2010) y Yamasaki *et al.* (2003a).

#### 4.1.2.5. Regulación del sistema inmune

Los efectos del ALC sobre el sistema inmune es el área de investigación relativamente más reciente, y se ha enfocado principalmente en el efecto que tiene el ALC sobre la síntesis de inmunoglobulinas (Sugano *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 2003b) y PGE<sub>2</sub>, pues se ha propuesto que este ácido graso podría tener efectos favorables en la prevención y tratamiento de ciertas alergias alimentarias o respuestas inflamatorias (Sugano *et al.*, 1998; O'Shea *et al.*, 2004).

En cerdos, se ha visto que el consumo de ALC afecta el desarrollo de células inmunes. El ALC afecta la diferenciación de los timocitos inmaduros (incrementando la proporción de linfocitos CD8<sup>+</sup>), modula la maduración de los linfocitos T y aumenta la actividad de la

granzima de los linfocitos activados (Bassaganya-Riera *et al.*, 2001a,b), y reduce la cantidad de eosinófilos, lo cual indica que ejerce un efecto antiinflamatorio (Ostrowska *et al.*, 2004). También se ha visto que disminuye la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF $\alpha$  (Changhua *et al.*, 2005) y la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Cheng *et al.*, 2004) de los macrófagos. Además, incrementa la concentración de IgA, IgG e IgM en el calostro de cerdas alimentadas con dietas adicionadas con ALC, y aumenta la concentración de IgG en el plasma de los lechones (Rossi *et al.*, 2004).

En ratones, se ha visto que el consumo de ALC (43:46; *cis*9, *trans*11: *trans*10, *cis*12) incrementa la proliferación de los linfocitos del bazo; siendo esta proliferación mayor en ratones jóvenes (Hayek *et al.*, 1999). Al alimentar ratones con los isómeros *cis*9, *trans*11 o *trans*10, *cis*12 purificados, se ha observado que el isómero *cis*9, *trans*11 incrementa la proporción de células T del tipo CD8<sup>+</sup> sin afectar la producción de inmunoglobulinas; mientras que el isómero *trans*10, *cis*12 aumenta la proporción de linfocitos B y los niveles de IgA e IgM. Lo anterior indica que los isómeros *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12 inducen una respuesta inmune diferente (Yamasaki *et al.*, 2003b). En ratas, se ha reportado que el consumo de dietas adicionadas con 0.5 ó 1% de ALC disminuye la secreción de IgE en 6 y 30% respectivamente, en el nódulo mesentérico linfático (Sugano *et al.*, 1998); pero incrementa la secreción de la IgA, IgG e IgM en plasma (Sugano *et al.*, 1998; Ramírez-Santana *et al.*, 2009) y de IgA e IgG en leche (Ramírez-Santana *et al.*, 2009). Aunque la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos, así como su concentración en suero es mucho menor que en el nódulo mesentérico linfático, el ALC estimula su producción (Sugano *et al.*, 1998); pero se ha observado una dependencia entre la concentración de ALC en la dieta y la producción de inmunoglobulinas (Yamasaki *et al.*, 2000b). También se ha visto que el ALC disminuye la producción de IL-6 de los macrófagos peritoneales, así como la producción de TNF $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> del hígado (Tarek *et al.*, 1998).

En aves se ha reportado que el consumo de ALC incrementa la concentración plasmática de la IgG (Takahashi *et al.*, 2003), la actividad de la lisozima en suero y bazo, además de aumentar la proliferación de células sanguíneas mononucleares y disminuir la síntesis de PGE<sub>2</sub> por los linfocitos sanguíneos (Zhang *et al.*, 2005a,b). Al igual que en ratas (Sugano *et*

*al.*, 1998), en pollos de engorda el ALC disminuye los efectos negativos del sistema inmune (pérdida de tejido corporal; Miller *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2002b).

En humanos se ha encontrado que el consumo de ALC (mezcla de isómeros o los isómeros *cis*9, *trans*11 o *trans*10, *cis*12 purificados), ayuda a aumentar la proliferación de anticuerpos (Albers *et al.*, 2003; Tricon *et al.*, 2004b). En sujetos sanos el consumo de ALC disminuye la producción de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e incrementa la producción de la IL-10 en macrófagos; pero además incrementa la producción de IgA e IgM, y disminuye la de IgE (O'Shea *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). En células Jurkat (línea celular inmortalizada de linfocitos T, obtenida de un niño con leucemia linfocítica aguda) la adición de ALC [(50:40; *cis*9, *trans*11: *trans*10, *cis*12), 50 a 200  $\mu$ M], además de inhibir su proliferación aumenta la producción de las citoquinas: IL-2 e IFN $\gamma$  (Luongo *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros estudios, al suplementar con mezclas de ALC (50:50 o 80:20; *cis*9, *trans*11: *trans*10, *cis*12), a personas sanas, no se observó un efecto importante en el mejoramiento de los indicadores de la función inmune (moléculas solubles de adhesión intracelular tipo 1, producción de IL-4, PGE<sub>2</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub>; Nugent *et al.*, 2005).

En cuanto a la función celular de los monocitos y macrófagos, se ha reportado que los macrófagos de humanos que consumieron ALC presentaron entre 61 y 73% mayor actividad fagocitaria (Stachowska *et al.*, 2007); mientras que en ratas, cerdos y perros, su actividad incrementa a más del doble (Cook *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). Dicha mejora en la actividad fagocitaria parece estar ligada a una disminución en la producción de la ciclooxigenasa 2 (Cox-2), y por lo tanto, a la disminución en la síntesis de PGE<sub>2</sub> por los macrófagos (Stachowska *et al.*, 2007).

El mecanismo de cómo el ALC modula el sistema inmune no está determinado; sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de cómo puede regularlo. Uno de los mecanismos por el cual se puede explicar el efecto del ALC sobre la respuesta inmune es la propuesta por Pariza *et al.* (2000), los cuales proponen que el ALC puede tener un efecto sobre la producción de TNF $\alpha$  al alterar las señales de los eicosanoides. Lo anterior es debido a que el consumo de ALC puede modificar el perfil de ácidos grasos de la membrana celular, con lo cual se afecta la producción de metabolitos de los eicosanoides como la PGE<sub>2</sub> (Li y

Watkins, 1998) y por lo tanto las señales de las células. Lo anterior es de suma importancia debido a que el contacto entre células es importante durante el desarrollo de las funciones de los linfocitos B y T (O'Shea *et al.*, 2004).

Otro mecanismo propuesto es que el ALC interactúa con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Los PPARs, al unirse a elementos de respuesta, inducen o reprimen la transcripción de genes blanco (Yu *et al.*, 2002). Por un lado, tenemos que los isómeros del ALC son unos potentes moduladores de los PPARs (Houseknecht *et al.*, 1998; Moya-Camarena *et al.*, 1999), y hay evidencia de que el ALC puede suprimir la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de ciertas proteínas (Changhua *et al.*, 2005). Por otro lado, tenemos que los receptores de estos ácidos grasos están ampliamente distribuidos en el sistema inmune, además de estar involucrados en la regulación de varios genes que controlan la proliferación de linfocitos y monocitos o macrófagos, apoptosis y reacciones de inflamación; además de afectar la diferenciación de los monocitos y macrófagos (Tontonoz *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2002), y la cantidad de antígenos que presentan este tipo de células, lo cual puede afectar la subsecuente respuesta celular y humoral al desafío de antígenos, afectando con esto la respuesta adaptativa e innata (Tontonoz *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005b).

#### **4.1.2.6. Actividad antioxidante y prooxidante**

La información sobre el efecto antioxidante atribuido al ALC es menor, menos clara y más controversial que las acciones biológicas antes descritas. Algunos estudios iniciales han demostrado que el ALC actúa como antioxidante (Ha *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1991); mientras que otros sugieren que actúa como un prooxidante (van den Berg *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Igarashi y Mizayawa, 2001).

Con respecto al efecto antioxidante que se propone que tiene el ALC, se ha observado que este depende del modelo usado en los estudios. Así, tenemos que en modelos *in vitro* se ha reportado que el ALC disminuye significativamente la concentración de peróxidos y que es más potente que el ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol, y que al menos es igual de potente que el butilhidroxitolueno (BHT; Ha *et al.*, 1990; Figura 32).

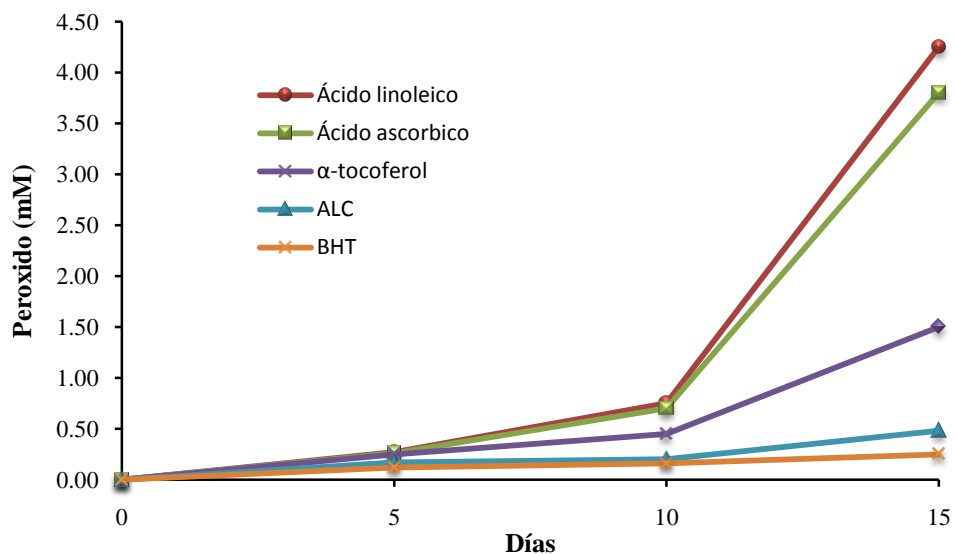


Figura 32. Comparación del ALC con otros antioxidantes. El ácido linoleico (375  $\mu\text{mol}$ ) fue incubado sólo o con 0.375  $\mu\text{mol}$  de ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, ALC o BHT durante 15 días para comparar su actividad antioxidante. Adaptado de: Ha *et al.* (1990).

En otros estudios en los cuales se han utilizado células fibroblásticas, se ha reportado que el ALC incrementa la respuesta antioxidativa al aumentar la síntesis celular de glutatión (GSH) durante las primeras 48 horas, manteniéndose esta respuesta por más de siete días (Figura 33), además de no inducir lipoperoxidación (Arab *et al.*, 2006; Figura 34). Adicionalmente, se ha visto que en células hepáticas de rata el ALC es más efectivo para proteger a los microsomas de la peroxidación que la vitamina A (Palacios *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros estudios en los cuales se han utilizado el mismo tipo de células se ha reportado que el ALC disminuye la actividad de algunas enzimas con actividad antioxidante (Cantwell *et al.*, 1999; Figura 35).

También se ha observado que al medir la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la glándula mamaria de ratas alimentadas con ALC se reduce la actividad oxidativa (Ip *et al.*, 1991; Figura 36).

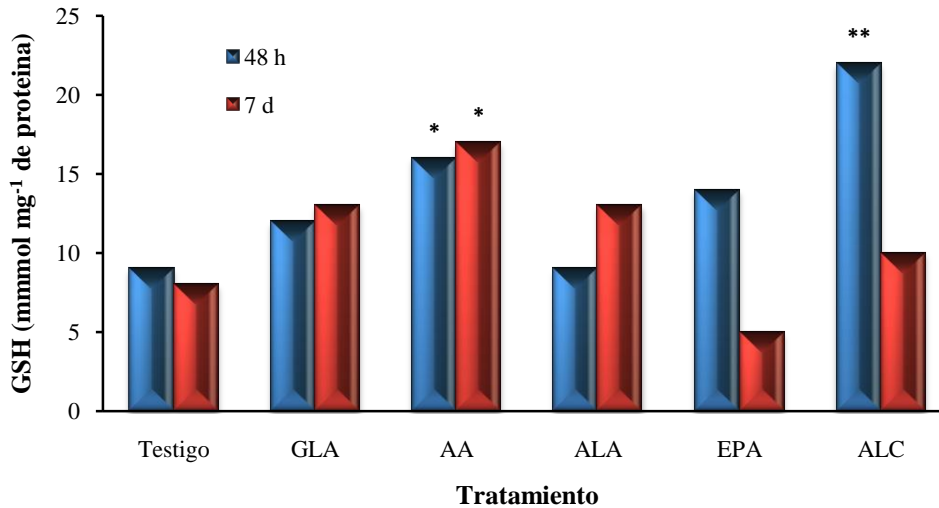


Figura 33. Concentración de glutatión (GSH) en células suplementadas con ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA), ácido araquidónico (AA), ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido eicopentanoico (EPA) o ácido linoleico conjugado (ALC). Los asteriscos indican diferencia (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$ ) entre la respuesta a los diferentes ácidos grasos y el testigo. Fuente: Arab *et al.* (2006).

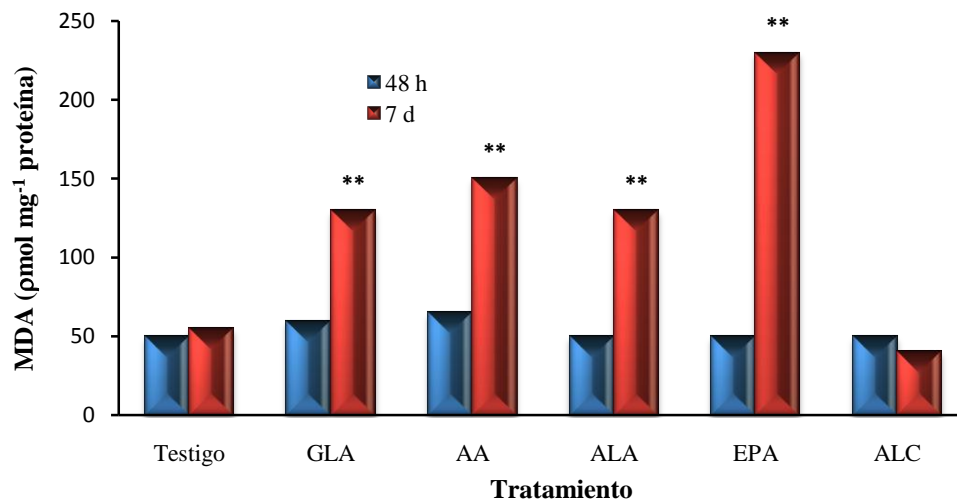


Figura 34. Lipoperoxidación medida como contenido celular de malondialdehído (MDA) después de dos periodos de suplementación con ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA), ácido araquidónico (AA), ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido eicopentanoico (EPA) o ácido linoleico conjugado (ALC). Los asteriscos indican diferencia (\*\* $P<0.001$ ) entre la respuesta a los diferentes ácidos grasos y el testigo. Adaptado de: Arab *et al.* (2006).

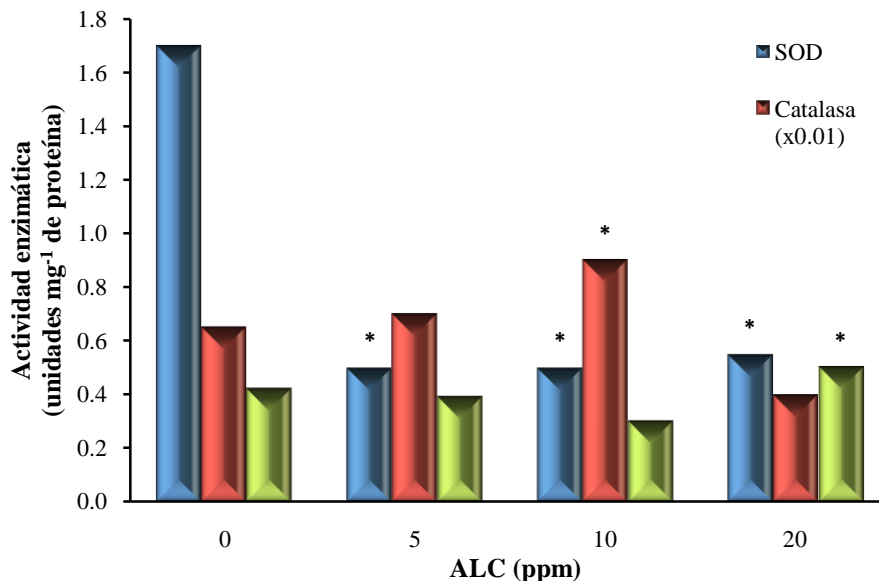


Figura 35. Efecto del ALC sobre la actividad específica de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) en hepatocitos de rata. Los asteriscos indican cambios relativos con respecto al testigo. Adaptado de: Cantwell *et al.* (1999).

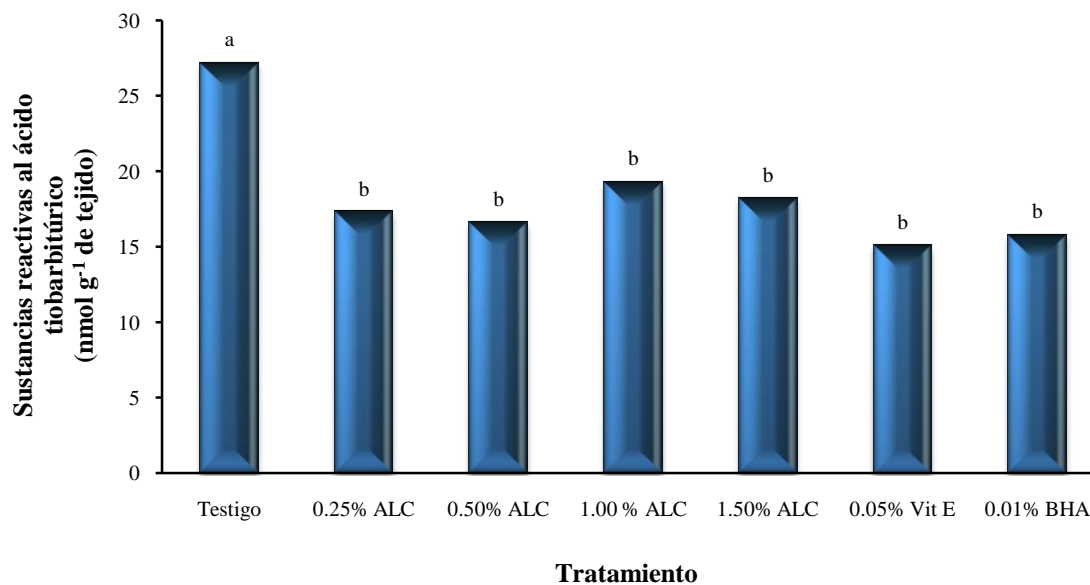


Figura 36. Efecto del ALC, vitamina E o BHA sobre las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la glándula mamaria de ratas Sprague-Dawley. Literales diferentes sobre las barras indican diferencias ( $P < 0.05$ ). Fuente: Ip *et al.* (1991).



Lo anterior se puede deber a que la suplementación de la dieta con ALC incrementa la acumulación de ALC y sus metabolitos en los tejidos (ácidos grasos con dobles ligaduras conjugadas; Sébédio *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Banni *et al.*, 1999), disminuyendo la concentración de los metabolitos del ácido linoleico (principalmente ácido araquidónico; los cuales son más susceptibles a ser oxidados y formar malondialdehído; Banni *et al.*, 1999), evitando con esto la peroxidación de los tejidos ricos en lípidos neutros. A este respecto, se ha observado que el ALC puede disminuir la formación de malondialdehído en músculo esquelético y microsomas hepáticos debido a que disminuye la concentración de ácido araquidónico (Livisay *et al.*, 2000). Adicionalmente, se ha observado que el ALC inhibe significativamente la oxidación de triglicéridos ricos en ácidos grasos n-3 (ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico; Fagali y Catalá, 2008), y además tiene la capacidad de reaccionar e inhibir los radicales libres (Leung y Liu, 2000; Kim *et al.*, 2004; Fagali y Catalá, 2008), principalmente por el isómero *trans*10, *cis*12 (Leung y Liu, 2000).

Otros estudios realizados en ratas han encontrado que el ALC (80%, *cis*9, *trans*11), disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por un incremento en la capacidad antioxidativa, al aumentar los niveles de producción de glutatión reducido (GSH) y de enzimas con capacidad antioxidante en hígado (manganeso-superóxido dismutasa, MnSOD; glutatión peroxidasa, GPx; glutatión reductasa, GR; Choi *et al.*, 2007). Lo anterior, puede explicar la reducción en la oxidación de los lípidos y oximioglobina en embutidos de res (Hur *et al.*, 2004) y pollo (Du *et al.*, 2000) en los cuales el ALC al parecer mejora su estabilidad. En cerdos alimentados con dietas adicionadas con ALC (1:1; *cis*9, *trans*11: *trans*10, *cis*12) se ha observado que se reduce la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos. Para explicar esta respuesta se ha propuesto que el ALC puede actuar mediante un mecanismo directo, en el cual el isómero *cis*9, *trans*11 se integra en elevadas concentraciones en los fosfolípidos del hígado, disminuyendo con esto la susceptibilidad a la oxidación de los fosfolípidos de este tejido. Por otro lado, el ALC puede actuar como antioxidante mediante un mecanismo indirecto derivado de su habilidad para modificar el perfil de ácidos grasos de los tejidos hacia un perfil de ácidos grasos más saturados (Du *et al.*, 2000; Eggert *et al.*, 2001; Joo *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2008a) y de disminuir la cantidad de grasa total en las canales (Zanini *et al.*, 2006).

En cuanto a sus propiedades prooxidantes, aunque se ha dicho que el ALC es un compuesto estable (Shantha *et al.*, 1995) y que su estructura lo hace menos susceptible al ataque de los radicales libres (Du *et al.*, 2000), en estudios *in vitro* se ha observado que cuando el ALC es adicionado a aceite de canola en una concentración que va de 0.1 a 1.0 % y es calentado a 90 °C, el ALC actúa como un prooxidante de forma dependiente al nivel de adición (Chen *et al.*, 1997; Figura 37). Además, se ha observado que es más susceptible a la oxidación y es menos estable que los ácidos docosahexaenoico, araquidónico, linolénico o linoleico (van den Berg *et al.*, 1995; Zhang y Chen, 1997; Luna *et al.*, 2007; Fagali y Catalá, 2008). Sin embargo, cuando se mezcla con ácido linoleico la tasa de oxidación del ácido linoleico incrementa mientras que la del ALC disminuye (van den Berg *et al.*, 1995).

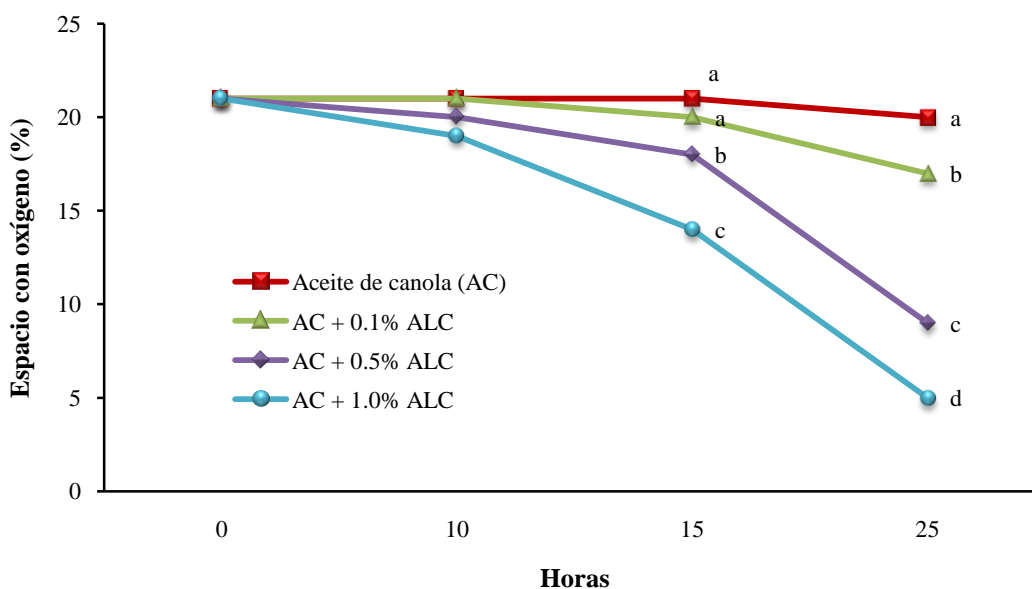


Figura 37. Efecto de la adición de ácido linoleico conjugado (ALC) en la oxidación de aceite de canola a 90 °C. Literales diferentes en el mismo punto en el tiempo indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ). Adaptado de: Chen *et al.* (1997).

Por otro lado, al comparar el potencial antioxidativo del ALC, vitamina E, e butilhidroxitolueno (BHT) usando fosfolípidos insaturados (1-pamitoil-2-linoleil fosfatidil

colina) de membranas que fueron expuestas a oxiradicales, se observó que, mientras la vitamina E y el BHT disminuyen significativamente la oxidación, el ALC sólo disminuye marginalmente la oxidación en comparación con el tratamiento testigo (van den Berg *et al.*, 1995). Pero al comparar el potencial antioxidativo del ácido linoleico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y de los isómeros *cis9*, *trans11*, y *trans10*, *cis12*, para inhibir la oxidación inducida por el  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -ácido metilbutírico, se encontró que el isómero *cis9*, *trans11* induce oxidación cuando es adicionado a una concentración de 200  $\mu$ M, pero presenta actividad antioxidativa a concentraciones de 2 y 20  $\mu$ M, mientras que el isómero *trans10*, *cis12* mantiene su actividad antioxidativa a 2, 20 y 200  $\mu$ M (Leung y Liu, 2000; Figura 38).

En otros estudios *in vitro* se ha observado que al enriquecer lipoproteínas de baja densidad (LDL) con 2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de ALC se acelera la tasa de oxidación; sin embargo, en estos modelos se ha observado que el ALC presenta el fenómeno de hormesis; es decir, a bajas concentraciones el ALC presenta actividad antioxidante, mientras que a altas concentraciones actúa como un prooxidante (Flintoff-Dye y Omaye, 2005).

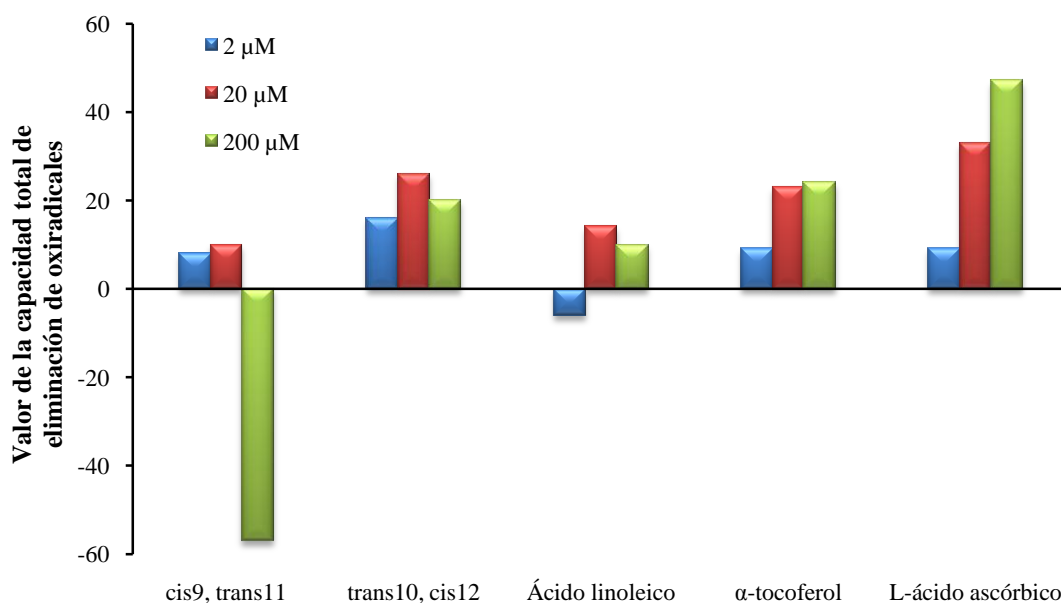


Figura 38. Valor total de la capacidad de eliminación de oxiradicales de los isómeros del ALC (*cis9*, *trans11* y *trans10*, *cis12*), ácido linoleico,  $\alpha$ -tocoferol, L-ácido ascórbico. Fuente: Leung y Liu (2000).

También, se ha reportado que el ALC estabiliza y protege contra la inactivación oxidativa a la proteína paraoxonasa 1 (PON1; proteína antioxidante asociada a las HDL; Figura 39). El isómero *cis9, trans11* es el que tiene mayor actividad protectora de la PON1; mientras que el AL antagoniza con el ALC en esta función protectora. El mecanismo propuesto para explicar esta acción protectora es que el ALC se une a un sitio específico, probablemente con un residuo de cisteína de la PON1 (Su *et al.*, 2003).

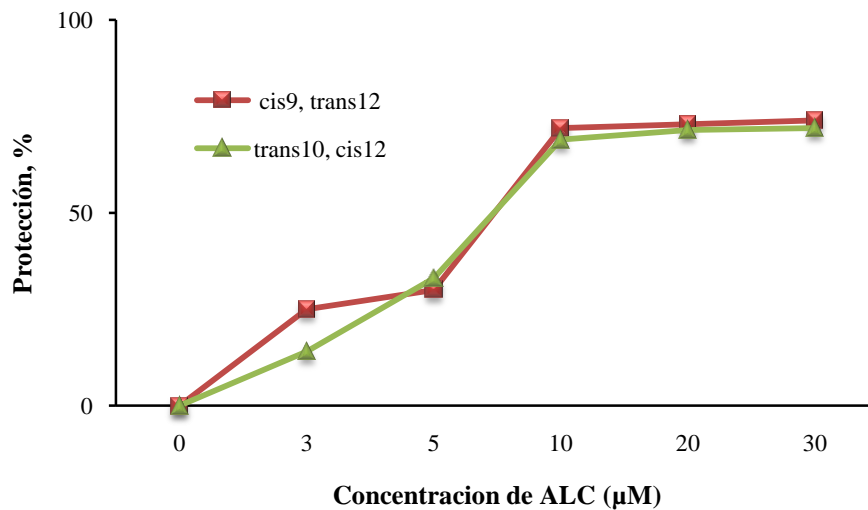


Figura 39. Acción protectora de los isómeros de ALC contra la inactivación de la paraoxonasa 1 (PON1) por el ascorbato/Cu<sup>2+</sup>. La protección es expresada como el porcentaje de actividad perdida bajo condiciones de inactivación y restablecimiento por el ácido graso. Modificado de: Su *et al.* (2003).

Por otro lado, en estudios *in vivo* se ha encontrado que el consumo de ALC incrementa la concentración de los marcadores del estrés oxidativo en la orina (8-iso-PGF<sub>2α</sub> y 15-keto-dihidro-PGF<sub>2α</sub>; Basu *et al.*, 2000; Risérius *et al.*, 2002).

Como se puede observar, existe mucha controversia sobre el efecto antioxidativo del ALC, por lo que esta es otra área de investigación que requiere de mucha más información y exactitud en el desarrollo de los modelos de estudio y en la interpretación de los resultados.

## 4.2. Nucleótidos

Los nucleótidos son compuestos formados por una base nitrogenada unida a una pentosa y con al menos un grupo fosfato. La base nitrogenada puede ser una purina o pirimidina. La pentosa puede ser una ribosa para formar el ácido ribonucleico (ARN), o una 2-deoxiribosa para formar el ácido desoxirribonucleico (ADN; Rudolph, 1994; Carver y Walker, 1995; Carver, 1999; Nelson *et al.*, 2001).

Los nucleótidos participan en el proceso de división celular, crecimiento celular y modulación del sistema inmune; además de participar como precursores de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), también originan fuentes de energía (ATP y GTP), y son componentes de los cofactores FAD, NAD, S-adenosilmetionina y coenzima A, así como de la UDP-glucosa y CDP-diacilglicerol. Además, algunos nucleótidos, como el cAMP y el cGMP, actúan como segundos mensajeros (Carver y Walker, 1995; Carver, 1999; Nelson *et al.*, 2001). Aunque estos compuestos no se consideran esenciales, en algunas situaciones especiales pueden considerarse como semiesenciales o esenciales, particularmente cuando el organismo necesita una mayor cantidad de nucleótidos de la que puede sintetizar, como ocurre en periodos de rápido crecimiento, enfermedad o cuando hay un consumo limitado de nutrientes (Uauy *et al.*, 1994; Carver y Walker, 1995; Yu, 1998; Carver, 1999).

### 4.2.1. Síntesis de los nucleótidos

La síntesis de los nucleótidos se realiza por dos vías principales: *de novo* y recuperación (Figura 40). La síntesis *de novo* comienza a partir de aminoácidos precursores (glutamato, aspartato, glicina), ribosa-5-fosfato, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Las vías de recuperación reciclan las bases libres y los nucleósidos liberados a partir de la degradación de los ácidos nucleicos intracelulares y los provenientes de la dieta. La síntesis *de novo* de las purinas y pirimidinas es idéntica en casi todos los seres vivos. La estructura del anillo de purina se forma al unir la glicina, aspartato, glutamina, derivados del tetrahidrofolato y CO<sub>2</sub> a la ribosa. El anillo de pirimidina se sintetiza como orato, unido a ribosa fosfato, y se convierte en los nucleótidos de pirimidina que son utilizados en la síntesis de los ácidos nucleicos (Figura 41; Carver y Walker, 1995; Grimble y Westwood, 2001; Nelson *et al.*, 2001).

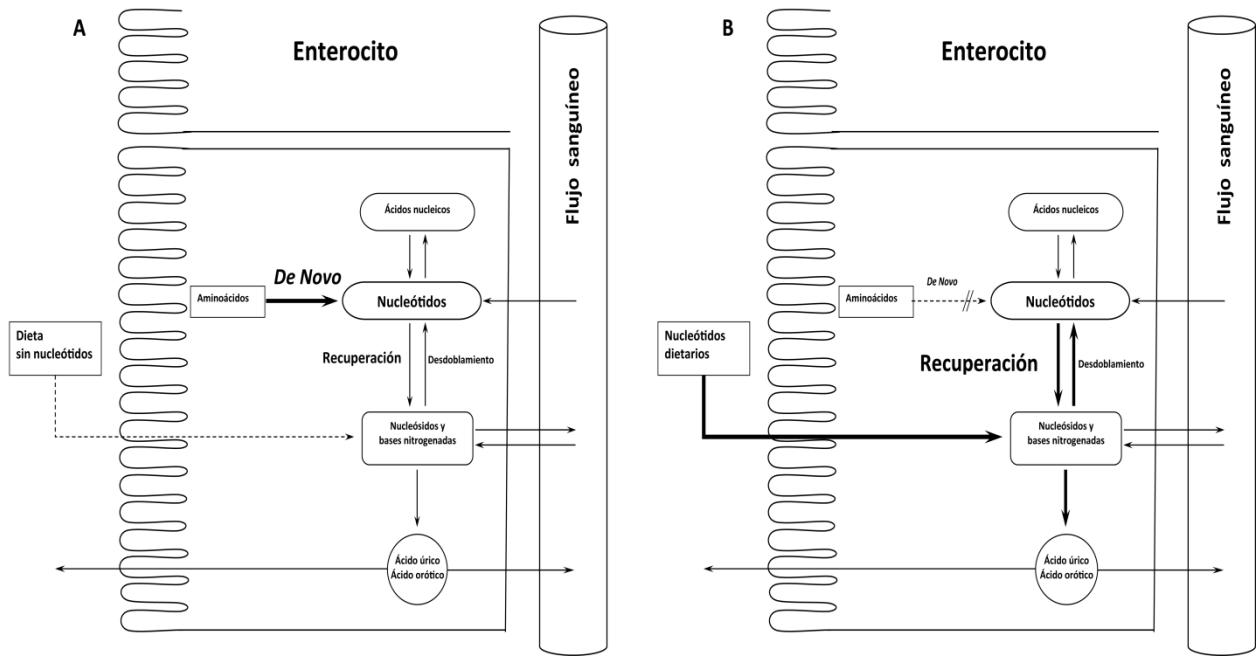


Figura 40. Regulación metabólica de los nucleótidos en el enterocito en presencia y ausencia de nucleótidos en la dieta. A, muestra la síntesis de nucleótidos por la vía *de novo*, la cual es mayor en animales que consumen dietas sin nucleótidos; B, muestra como los nucleótidos dietarios activan la síntesis de nucleótidos por la vía de recuperación. Fuente: Quan *et al.* (1990).

En los mamíferos, la síntesis de los nucleótidos se da por las vías *de novo*. Este proceso se lleva a cabo principalmente en el citosol del hepatocito, lugar donde se encuentran disponibles todas las enzimas para que se lleve a cabo la síntesis de purinas y pirimidinas. Aunque en el intestino delgado también se pueden sintetizar nucleótidos, la capacidad de síntesis en este órgano es limitada (Schlimme *et al.*, 2000). Los precursores que dan origen a las pirimidinas son el  $\text{CO}_2$  y la glutamina, en donde, por acción de la carbamoil fosfato sintasa II se produce el fosfato de carbamoilo. Este último compuesto, junto con el aspartato, son los que se podría decir que dan origen a los nucleótidos pirimídicos. El monofosfato de uridina (UMP) se forma en un proceso de 6 reacciones a partir de los precursores iniciales; mientras que el trifosfato de citidina (CTP) y el monofosfato de timidina (TMP) se sintetizan en tres y cuatro reacciones adicionales, respectivamente, en forma ramificada a partir del UMP (Carver y Walker, 1995; Rodwell, 2004).

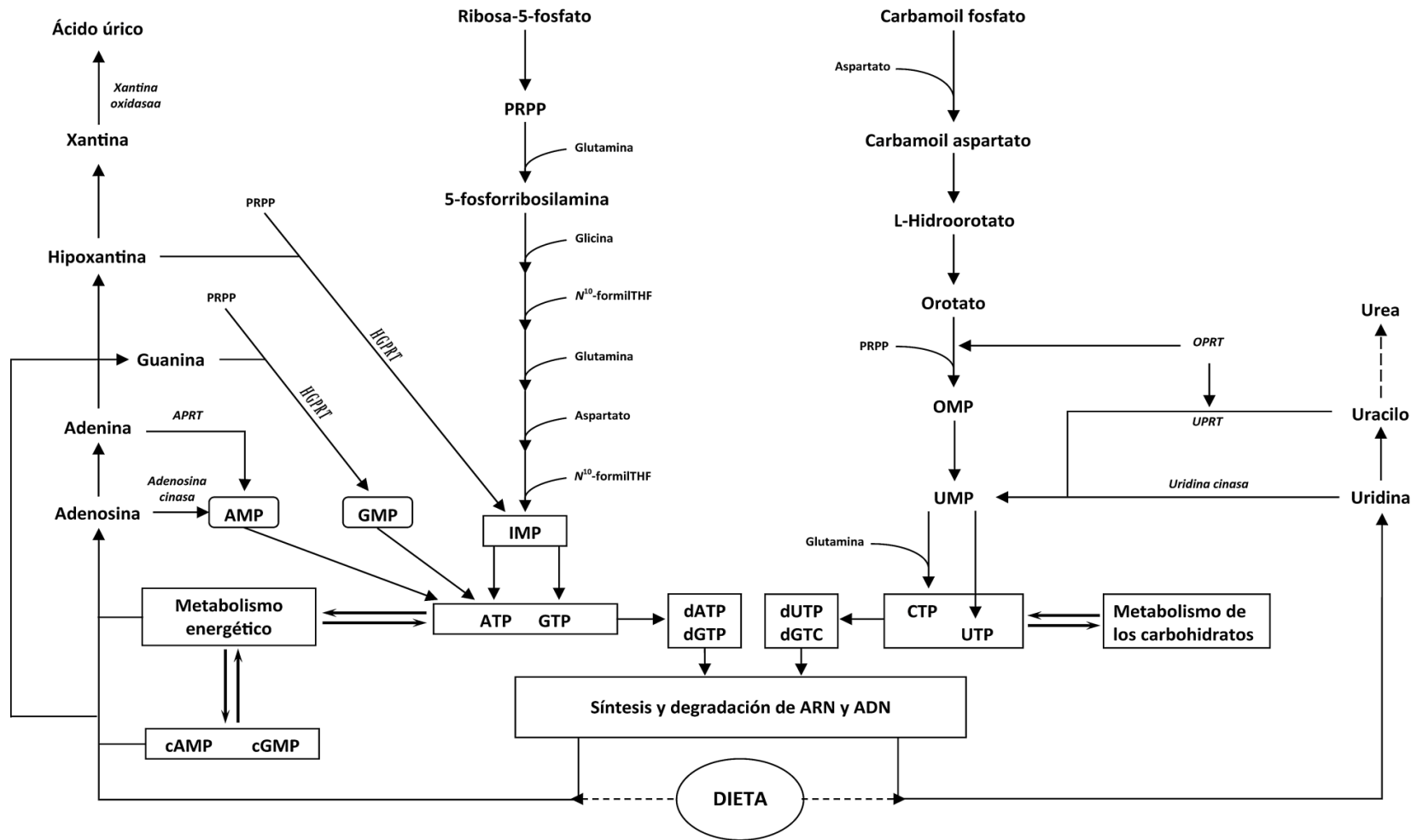


Figura 41. Rutas metabólicas de las purinas y pirimidinas. APRT, adenina fosforribosiltransferasa; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa; N<sup>10</sup>-formilTHF, ácido N<sup>10</sup>-formiltetrahidrofólico; OPRT, orotidina fosforribosiltransferasa; PRPP, fosforribosil pirofosfato. Fuente: Glimble y Westwood (2001). Reproducido con permiso del editor.

La síntesis de los nucleótidos (purinas y pirimidinas) por las vías *de novo* es un proceso energéticamente muy costoso, mientras que su síntesis por las vías de recuperación es energéticamente más económica (Cosgrove, 1998), debido a que por éstas vías la síntesis de los nucleótidos se lleva a cabo a partir del uso de bases nitrogenadas o nucleósidos provenientes de la dieta, hígado o de los ácidos nucleicos intracelulares liberados por degradación celular (Sanderson y He, 1994; Carver y Walker, 1995; Rodwell, 2004). A diferencia de la síntesis *de novo*, que es prácticamente idéntica en todas las células, las vías de recuperación son diversas. En los mamíferos, las purinas son recuperadas principalmente por medio de dos enzimas: la adenina fosforibosiltransferasa (APRT), la cual forma AMP a través de la transferencia de adenina al fosforribosil pirofosfato con la liberación de Pi; y la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT), que cataliza una reacción análoga tanto para hipoxantina como para guanina (Carver y Walker, 1995). En cuanto a la recuperación de las bases pirimídicas, estas tienen menor importancia que las purinas, debido a la alta solubilidad de los productos de su catabolismo. Sin embargo, la recuperación de timidina para la síntesis de nucleótidos es importante en la preparación de la célula para su división (Rodwell, 2004).

#### **4.2.2. Absorción de los nucleótidos**

De los nucleótidos ingeridos en la dieta, una pequeña fracción corresponde a nucleótidos libres y el resto a nucleoproteínas y ácidos nucleicos. Las nucleoproteínas son metabolizadas a ácidos nucleicos en el tubo digestivo por acción de enzimas proteolíticas. Los ácidos nucleicos son degradados a di, tri y poli-nucleótidos por nucleasas pancreáticas, y con la acción adicional de polinucleotidasas y fosfoesterasas intestinales se producen los mononucleótidos; los nucleótidos liberados son hidrolizados a nucleósidos por acción de la fosfatasa alcalina y nucleotidasas, y probablemente sean desdoblados a purinas y pirimidinas por acción de nucleosidasas (Quan *et al.*, 1990; Figura 42). En los animales, los nucleósidos son la principal forma de absorción, y más del 90% de los nucleósidos y bases nitrogenadas son absorbidas al interior del enterocito (Salati *et al.*, 1984; Rudolph, 1994; Calver y Walker, 1995).



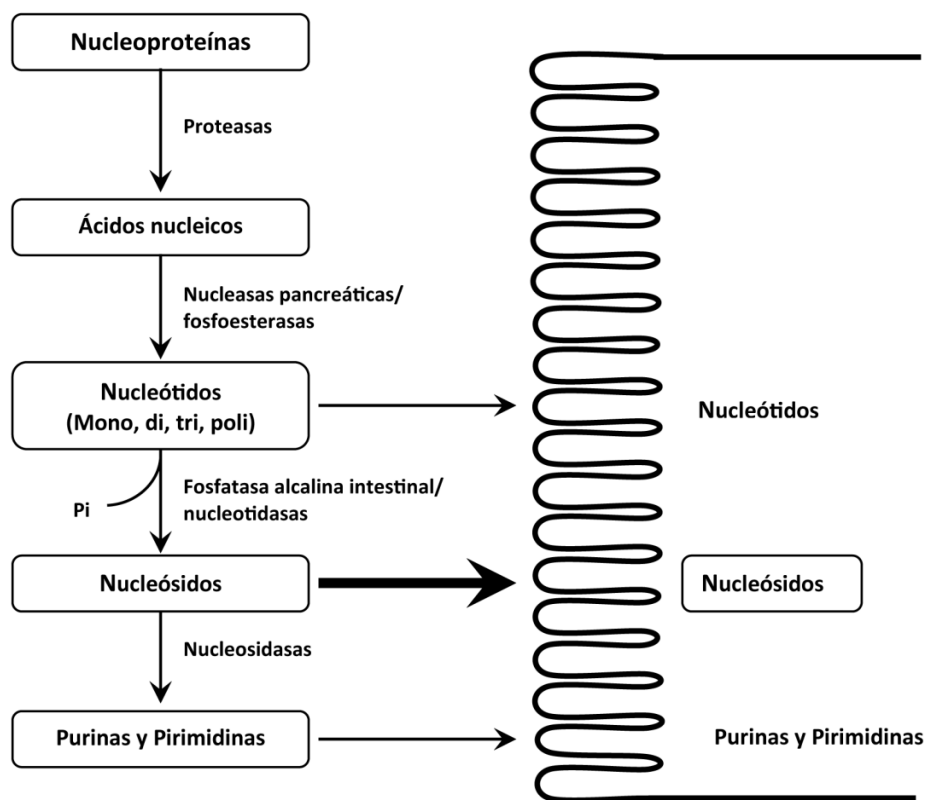


Figura 42. Digestión y absorción de los ácidos nucleicos y sus productos. Fuente: Quan *et al.* (1990).

El transporte de los nucleósidos en el enterocito se lleva a cabo por difusión facilitada y por transporte dependiente de  $\text{Na}^+$  (Bronk y Hastewell, 1987). Una vez que los nucleósidos y bases nitrogenadas son absorbidos, inmediatamente son metabolizados en el enterocito, y los productos de su catabolismo son excretados en la orina y heces (Sonada y Tatibana, 1978; Ho *et al.*, 1979). En los humanos, los nucleótidos, nucleósidos y bases nitrogenadas púricas son metabolizadas a ácido úrico, mientras que las pirimidinas son degradadas a  $\beta$ -alanina y ácido  $\beta$ -aminoisobutírico (Carver y Walker, 1995; Mateo *et al.*, 2004). A pesar de la elevada tasa de degradación que sufren los nucleótidos dietarios, se ha visto que del 2 al 5% de los nucleótidos del alimento son incorporados a los tejidos, principalmente en el intestino delgado, hígado y músculo esquelético (Carver y Walker, 1995; Ho *et al.*, 1979) incrementando la tasa de incorporación al aumentar la concentración de nucleótidos de la dieta, debido a que se estimula la recuperación de estos compuestos en el intestino delgado,

principalmente en periodos de rápido crecimiento o consumo limitado de nutrientes (Carver, 1999).

### **4.2.3. Funciones biológicas de los nucleótidos**

Los nucleótidos y sus metabolitos son importantes en muchos procesos biológicos, pero, debido a que pueden ser sintetizados endógenamente, estos no son considerados esenciales. Sin embargo, se ha reportado que la adición de nucleótidos a la dieta promueve el crecimiento y la maduración intestinal (Uauy *et al.*, 1994; Yu, 1998), mantiene la integridad intestinal, reduce la incidencia de enfermedades entéricas en animales débiles o estresados por cambios ambientales o nutricionales (Gonçalves *et al.*, 2005), modifica el tipo y crecimiento de la microflora intestinal (Núñez *et al.*, 1990; Uauy *et al.*, 1994) e incrementa la respuesta inmune celular y humoral (Kulkarni *et al.*, 1994; Carver, 1999; Maldonado *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2008); además, se ha visto que pueden modificar el metabolismo de los lípidos (DeLucchi *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1992; Sánchez-Pozo *et al.*, 1994; Siahaidou *et al.*, 2004) y la función hepática (Carver y Walker, 1995; Carver, 1999).

#### **4.2.3.1. Efectos en el tubo digestivo**

El epitelio intestinal es un tejido de rápido crecimiento y elevada tasa de renovación. Para sostener esta elevada tasa metabólica, los nucleótidos endógenos provenientes del hígado y de la renovación celular se hacen disponibles a la mucosa del tubo digestivo (Carver, 1999). Sin embargo, se ha reportado que los nucleótidos dietarios ayudan de forma importante en el crecimiento y diferenciación del tubo digestivo. En estudios en roedores recién destetados se ha visto que la adición de 1% de nucleótidos a la dieta incrementa la síntesis de proteína intestinal (Uauy *et al.*, 1990; López-Navarro *et al.*, 1996a), la altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas (Uauy *et al.*, 1990; Adjei *et al.*, 1996), el grosor de la pared intestinal (Adjei *et al.*, 1996), y el peso del intestino delgado (Carver, 1994). Adicionalmente, se ha observado que los nucleótidos dietarios aumentan el contenido de ADN y la actividad de las disacaridasas (Nuñez *et al.*, 1990; Uauy *et al.*, 1990), además de mejorar la histología y ultraestructura intestinal (Bueno *et al.*, 1994) en ratas con diarrea crónica. También promueven la curación de las úlceras en el intestino delgado (Sukumar *et al.*, 1997) e inhiben

la translocación de bacterias patógenas (Adjei y Yamamoto, 1995; Adjei *et al.*, 1996) en roedores.

En cerdos recién destetados se ha reportado que el consumo de dietas adicionadas con nucleótidos (1000 ó 2000 ppm) incrementa el tamaño de las vellosidades intestinales, además de reducir la incidencia de diarreas (750 ó 1000 ppm; Martínez-Puig *et al.*, 2007).

En infantes se ha observado que la suplementación de las formulas lácteas con nucleótidos (72 mg L<sup>-1</sup>) disminuye la incidencia de diarreas (Pickering *et al.*, 1998; Tsou Yau *et al.*, 2003), modifica la composición microbiana, incrementando el porcentaje de bifidobacterias y lactobacilos en heces, y disminuye la población de enterobacterias gram negativas (Gil *et al.*, 1986). El aumento de la población de bacterias lácticas tiene grandes beneficios para los infantes debido a que estas bacterias, al poder metabolizar los azúcares a ácido láctico, pueden disminuir el pH del colon, con lo que inhiben la proliferación de bacterias patógenas intolerantes a ambientes ácidos; además de inhibir el crecimiento de enterobacterias que causan diarrea (Uauy *et al.*, 1994).

#### **4.2.3.2. Efectos sobre el sistema inmune**

Se ha reportado que los nucleótidos juegan un importante papel en el mantenimiento de la respuesta inmune celular y humoral (Carver, 1999; Maldonado *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2008). Aunque los mecanismos de cómo los nucleótidos modulan el sistema inmune se desconocen, algunas investigaciones indican que la adición de nucleótidos a la dieta incrementa la disponibilidad de nucleótidos para estimular la proliferación de leucocitos, los cuales se renuevan rápidamente, con lo que se aumentan los requerimientos de estos compuestos (Carver y Walker, 1995).

Los linfocitos tienen la capacidad de sintetizar nucleótidos por las vías *de novo* sólo en la fase S de la división celular, y por las vías de recuperación en la fase G1, por lo que la reserva de purinas sólo se puede mantener por las vías de recuperación; sin embargo, la síntesis de nucleótidos pirimídicos por ésta última vía tiene una capacidad limitada (Perignon *et al.*, 1987), por lo que este mecanismo no proporciona las cantidades suficientes de nucleótidos para que los linfocitos proliferen (Marijnen *et al.*, 1989), lo cual significa que, para que haya

una adecuada proliferación y función de los linfocitos, es necesario un aporte exógeno de nucleótidos.

En roedores se ha visto que la adición de nucleótidos a la dieta incrementa la resistencia al desafío microbiano, la capacidad fagocitaria de los macrófagos, la producción de interleucina 2 (IL-2) del bazo, la hipersensibilidad cutánea tardía, el rechazo de injertos alogénicos, además de revertir la inmunosupresión inducida por la malnutrición o ayuno (Kulkarni *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1994; Yamauchi *et al.*, 1996). Además, el consumo de dietas adicionadas con nucleótidos promueven la expresión de antígenos en los linfocitos (Manzano *et al.*, 2003). En cerdos recién destetados el consumo de nucleótidos incrementa la concentración de IgM en plasma (Lee *et al.*, 2007).

En infantes nacidos a término, la adición de nucleótidos (33 ó 72 mg L<sup>-1</sup>) a las fórmulas lácteas incrementa la concentración de anticuerpos contra difteria y *Haemophilus influenzae* (Pickering *et al.*, 1998; Hawkes *et al.*, 2006), tétanos (Hawkes *et al.*, 2006) y hepatitis B (Tsou Yau *et al.*, 2003), además de aumentar la actividad de las células asesinas naturales y la producción de IL-2 (Carver *et al.*, 1991). Por otro lado, en infantes nacidos prematuramente, el consumo de fórmulas lácteas adicionadas con nucleótidos aumenta la concentración plasmática de IgA e IgM, IgG y  $\beta$ -lactoglobulina (Martínez-Augustin *et al.*, 1997a,b; Maldonado *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2008).

Aunque no se conocen los mecanismos de cómo los nucleótidos estimulan el sistema inmune, se ha propuesto que estos compuestos ejercen un efecto sobre la respuesta inmune al actuar como inductores o facilitadores en el incremento de la población de linfocitos T, con un efecto predominante en la fase inicial del procesamiento del antígeno y proliferación de los linfocitos (Van Buren *et al.*, 1985). También se ha propuesto que los nucleótidos dietarios pueden regular la producción de linfocitos en el bazo (Kulkarni *et al.*, 1992).

#### **4.2.3.3. Efectos sobre el metabolismo de los lípidos**

En estudios en animales se ha encontrado que la suplementación con nucleótidos a dietas para ratas recién destetadas incrementa la concentración plasmática del ácido docosahexaenoico, y de los ácidos docosahexaenoico y araquidónico en los microsomas hepáticos, lo cual indica que los nucleótidos dietarios pueden alterar la elongación de los

ácidos grasos esenciales (linoleico y  $\alpha$ -linolénico) a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Boza *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 1992; Nuñez *et al.*, 1993).

En infantes nacidos precozmente, la alimentación con fórmulas lácteas adicionadas con nucleótidos ( $37.6 \text{ mg L}^{-1}$ ) incrementa la concentración de triglicéridos en plasma, y la concentración de ácido linolénico en la membrana del enterocito (Axelsson *et al.*, 1997). Sin embargo, no aumenta la concentración de ácidos grasos de cadena larga en la membrana del enterocito (Henderson *et al.*, 1994; Woltil *et al.*, 1995). Por otro lado, en infantes nacidos a término, el consumo de fórmulas lácteas adicionadas con nucleótidos incrementa la concentración del ácido araquidónico (C20:4; n-6) y del ácido adrenico (C22:4; n-6) en la membrana plasmática del eritrocito (DeLucchi *et al.*, 1987). Adicionalmente, se ha observado que el consumo de nucleótidos puede modificar la proporción de lipoproteínas en sangre (Sánchez-Pozo *et al.*, 1994; Siahaniidou *et al.*, 2004).

Para explicar el efecto de los nucleótidos sobre el metabolismo de los lípidos se han propuesto dos mecanismos. Primero, los nucleótidos, al producir cambios en la composición microbiana intestinal, pueden afectar la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, debido a que las bacterias tienen las enzimas necesarias para introducir dobles enlaces en la cadena carbonada y elongar los ácidos grasos. Segundo, los nucleótidos pueden modular la elongación y desaturación de la cadena carbonada en el enterocito o hígado (Cosgrove, 1998).

#### **4.2.3.4. Efectos sobre la función hepática**

En algunos experimentos en roedores se ha observado que el consumo de dietas libres de nucleótidos afecta el tamaño, función y composición del hígado, además de afectar la síntesis de proteínas en este órgano (Novak *et al.*, 1994; López-Navarro *et al.*, 1996a,b); pero la adición de nucleótidos a las dietas mejora la función y regeneración hepática después de sufrir daño por cirrosis (Torres-López *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1997; Fontana *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2004) o hepatectomía parcial de este órgano (Ogoshi *et al.*, 1985; Jackson *et al.*, 1997).

### 4.3. Prostaglandinas

Las prostaglandinas (PG's) fueron descubiertas por primera vez en el plasma seminal de mamíferos, y se creía que estos compuestos sólo se producían en la próstata, por esto fueron llamadas "prostaglandinas" (Nelson *et al.*, 2001). Sin embargo, hoy se sabe que las prostaglandinas se producen prácticamente en todos los tejidos del cuerpo (Fransson y Spurgeon, 1995). Los ácidos araquidónico, dihomo- $\gamma$ -linolénico y eicosapentaenoico son los precursores de las prostaglandinas. Aunque originalmente se definieron sólo dos grupos de prostaglandinas (E y F), hoy se sabe que hay al menos ocho tipos de prostaglandinas (A, B, C, D, E, F, G, H), las cuales tienen diversas funciones fisiológicas (Fransson y Spurgeon, 1995). Entre las funciones fisiológicas que tienen las prostaglandinas se encuentran la agregación de plaquetas, homeostasis vascular (Samuelsson *et al.*, 1975), función renal (Smith, 1989; Adam y Wolfram, 1984), respuesta inflamatoria e inmune (Plescia *et al.*, 1975; Kuehl y Egan, 1980; Goodwin y Ceuppens, 1983), secreción hormonal (Metz, 1988; Olofsson y Leung, 1994), y señalamiento celular (Smith, 1989; Jones y Persaud, 1993; de Jonge *et al.*, 1996). Además, se ha reportado que juegan un papel importante en la etiología de varias enfermedades como la hipertensión (Iacono y Dougherty, 1993) y el desarrollo de tumores (Rao *et al.*, 1996).

Adicionalmente, se ha reportado que las prostaglandinas tienen varias funciones reproductivas. En hembras se ha observado que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) juega un papel importante en la ovulación, pues se ha visto que este compuesto la estimula, alterando su inicio y duración (Ainsworth *et al.*, 1975; Armstrong y Zamecnik, 1975; Wallach *et al.*, 1975; Espey *et al.*, 1982; Srikandakumar y Downey, 1989; Weiler y Claus, 1991). También se ha visto que, mientras la  $PGF_{2\alpha}$  induce luteólisis (Inskeep y Murdoch, 1980; Rothchild, 1981; Richardson, 1986; Auletta y Flint, 1988; Niswender y Nett, 1988; Michael *et al.*, 1994; Olofsson y Leung, 1994; Poyser, 1995; Arosh *et al.*, 2004), las prostaglandinas  $PGE_2$  y  $PGI_2$  tienen una función luteotrófica (Wiesak *et al.*, 1992; Michael *et al.*, 1993; Michael *et al.*, 1994; Arosh *et al.*, 2004). También se ha reportado que la  $PGF_{2\alpha}$  modifica el comportamiento maternal e induce el parto (Widowski *et al.*, 1990; Tsuboi *et al.*, 2000; Kaeoket, 2006). En machos se ha reportado que las prostaglandinas  $PGE_1$  y  $PGE_2$  estimulan la síntesis de esteroides (aldosterona, corticosterona y cortisol) en la glándula adrenal (Saruta y Kaplan, 1972); mientras que la  $PGF_{2\alpha}$  en machos estimula el deseo sexual o libido (Szurop *et al.*, 1985;

Narasimha Rao *et al.*, 1986; Estienne *et al.*, 2001; Kozink *et al.*, 2002; Estienne *et al.*, 2004; Masoumi *et al.*, 2008).

#### 4.3.1. Síntesis de la prostaglandina F<sub>2α</sub>

La PGF<sub>2α</sub> se sintetiza a partir del ácido araquidónico. Éste ácido graso proviene principalmente de dos fuentes: el que es sintetizado a partir del ácido linoleico proveniente de la dieta, y el que es liberado de los fosfolípidos de las membranas celulares. A partir de la dieta, el ácido linoleico es metabolizado por la enzima Δ6-desaturasa para producir ácido γ-linolénico, el cual a su vez es elongado para generar ácido dihomo-γ-linolénico, y este a su vez es metabolizado a ácido araquidónico (AA) por la acción de la enzima Δ5-desaturasa (Figura 43; Abayasekara y Wathes, 1999).

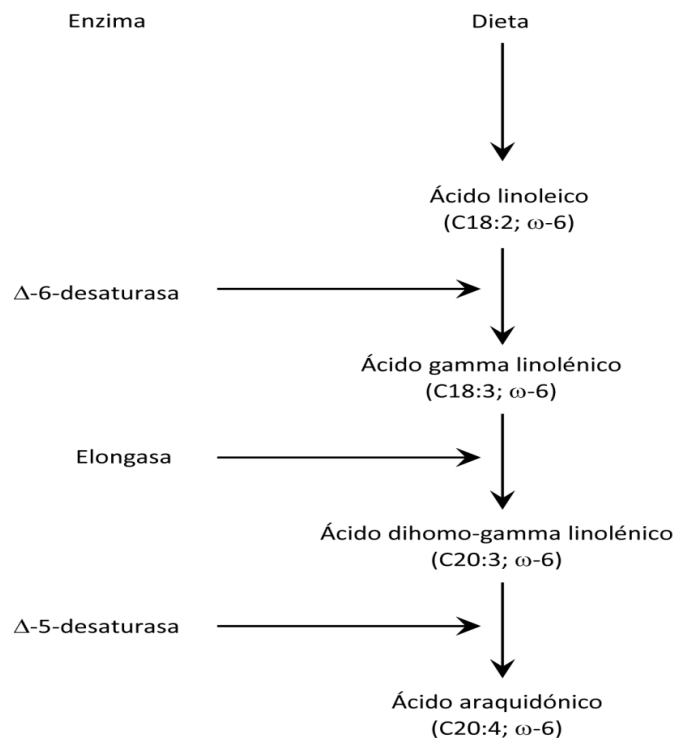


Figura 43. Síntesis del ácido araquidónico a partir del ácido linoleico dietario. Adaptado de: Abayasekara y Wathes (1999).

Una vez que se ha sintetizado el AA, las ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2; también conocidas como PGHS-1 y PGHS-2) metabolizan el AA a PGG<sub>2</sub> y este a su vez es

metabolizado por las mismas enzimas a  $\text{PGH}_2$ . Por acción de la PGF sintetasa, la  $\text{PGH}_2$  es metabolizada para producir  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Figura 44; Simmons *et al.*, 2004).

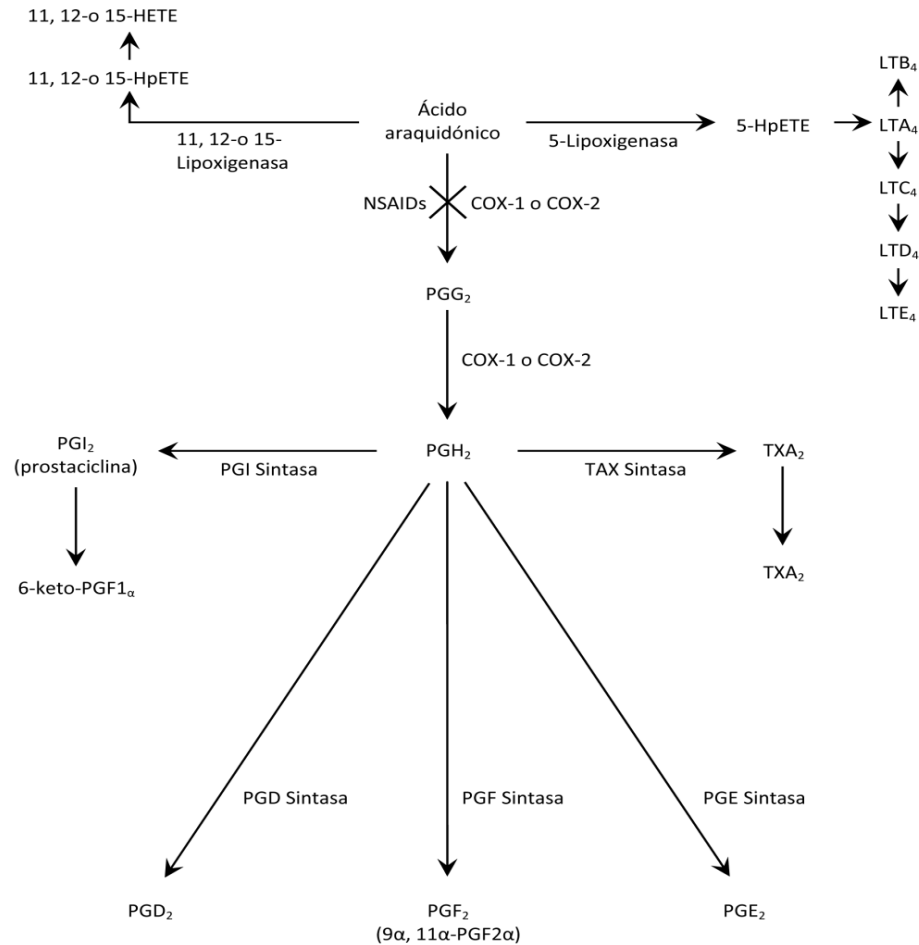


Figura 44. Ruta metabólica para sintetizar  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a partir de ácido araquidónico. El ácido araquidónico en las células es metabolizado por lipoxigenasas a ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) y ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs) o por ciclooxigenasas a prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ), derivada de la prostaglandina  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ). Las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs) bloquean la síntesis de la  $\text{PGG}_2$ . La  $\text{PGH}_2$  espontáneamente se reacomoda o es enzimáticamente isomerizada, oxidada o reducida para producir los isómeros bioactivos de las prostaglandinas. Adaptado de: Simmons *et al.* (2004).

Las prostaglandinas biológicamente más activas son las prostaglandinas de la serie 2, las cuales son derivadas del AA y este a su vez es derivado del ácido linoleico. Sin embargo, el



AA que forma parte de los fosfolípidos de las células se encuentra en forma esterificada. La generación de AA libre para sintetizar eicosanoides a partir de los fosfolípidos de la membrana celular es limitada, pero puede ser liberado directamente de los fosfolípidos por la acción de la enzima acil hidrolasa fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) o de forma indirecta por la enzima fosfolipasa C (PLC) y diacilglicérido lipasa. El AA liberado por estas dos rutas es inmediatamente re-esterificado o metabolizado a: prostaglandinas y tromboxanos por acción de la prostaglandina sintetasa (ciclooxigenasa); a leucotrienos y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) por la enzima lipoxigenasa; ó a ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) por las enzimas epoxigenasas dependientes de citocromo P450 (Abayasekara y Wathes, 1999; Zarco, 2006; Figura 45). Para que se sintetice PGF<sub>2α</sub> a partir del AA participan las mismas enzimas mencionadas anteriormente (Figura 44).

#### **4.3.2. PGF<sub>2α</sub> y comportamiento sexual en cerdos**

En el cerdo, como en todos los mamíferos, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es liberada desde el hipotálamo. La GnRH viaja a la pituitaria para estimular la liberación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). En los verracos, la LH y FSH estimulan la espermatogénesis y la secreción de testosterona y estradiol (E<sub>2</sub>); estas últimas hormonas mantienen la libido en los verracos (Louis *et al.*, 1994a; Estienne *et al.*, 2000; Hemsworth y Tilbrook, 2007). Lo anterior ha sido confirmado al restablecer el deseo sexual en cerdos castrados tratados con terapia de remplazo de testosterona y estradiol (Levis y Ford, 1989). Además, se ha determinado que la concentración de E<sub>2</sub> en sangre incrementa con la edad de los verracos (Estienne *et al.*, 2000); y que la concentración de esta hormona en sangre está inversamente relacionada con el tiempo requerido para montar y comenzar la eyaculación (Louis *et al.*, 1994a).

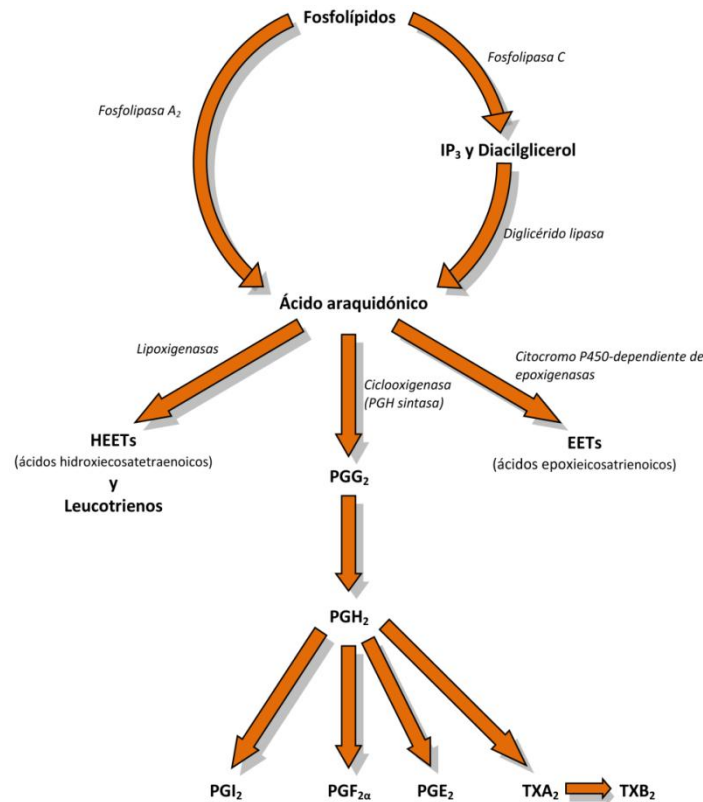


Figura 45. Ruta metabólica de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de la membrana celular. Fuente: Abayasekara y Wathes (1999).

El mecanismo por el cual la aplicación exógena de la  $PGF_{2\alpha}$  incrementa la libido no es claro, pero se ha planteado la hipótesis de que la  $PGF_{2\alpha}$  estimula la liberación de hormonas esteroides. Sin embargo, experimentalmente no se ha encontrado que la aplicación intramuscular de esta hormona a verracos estimule la liberación de testosterona o estrógenos (Fonda *et al.*, 1981; Estienne *et al.*, 2004); pero se ha encontrado que la secreción de prolactina y cortisol se incrementa en 452 y 262%, respectivamente, en los primeros 30 minutos después de la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$  (Fonda *et al.*, 1981).

Los resultados de experimentos en los cuales se ha aplicado  $PGF_{2\alpha}$  a verracos jóvenes sin experiencia sexual son controversiales. Algunos reportes indican que la aplicación exógena de  $PGF_{2\alpha}$  incrementa la libido (Szurop *et al.*, 1985; Estienne *et al.*, 2001; Kozink *et al.*, 2002) y el número de cerdos que montan exitosamente el maniquí de colección de semen (Szurop *et al.*, 1985; Estienne *et al.*, 2001); mientras que otros no han encontrado que la aplicación de la

PGF<sub>2α</sub> incremente el deseo sexual (Wettemann *et al.*, 1992). Sin embargo, las diferencias en los resultados obtenidos pueden ser debidas a la raza, edad o peso de los cerdos utilizados, protocolo de aplicación de la PGF<sub>2α</sub>, productos (prostaglandinas naturales o análogos) y dosis utilizadas en las diferentes investigaciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Raza, edad o peso, producto y dosis utilizadas en las diferentes evaluaciones del efecto de la aplicación de PGF<sub>2α</sub> exógena sobre el comportamiento sexual de verracos jóvenes.

Razas	Edad (meses)	Peso (kg)	Producto utilizado	Dosis (mg)	Autores
Holandés, Landrace Belga, Large White y Duroc	7.5	110	Cloprostenol sódico*	25	Szurop <i>et al.</i> , 1985
Hampshire	6.0	---	Dinoprost trometamina**	10 y 25	Wettemann <i>et al.</i> , 1992
Landrace×Yorkshire	9.6	192	Dinoprost trometamina**	10	Estienne <i>et al.</i> , 2001
Líneas terminales magras	5.9	113	Dinoprost trometamina**	5, 10 y 20	Kozink <i>et al.</i> , 2002

\* Enzaprost-F; \*\*Lutalyse.

Por otro lado, se ha observado que la aplicación de 10 mg de PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse®) a verracos con experiencia sexual (monta natural) para enseñarlos a montar el maniquí de colección de semen, incrementa el porcentaje de cerdos que montan el maniquí y eyaculan en su primera exposición (PGF<sub>2α</sub> vs. control; 86 vs. 29%; Figura 46), con lo que se reduce el tiempo requerido para entrenarlos; además, se reduce el tiempo de reacción (intervalo de tiempo entre la aplicación del tratamiento y el comienzo de la eyaculación; 267 vs. 440 s) y el número de montas falsas (monta del maniquí sin eyaculación; 0.6 vs. 3.9). Adicionalmente, se ha observado que la aplicación de PGF<sub>2α</sub> aumenta la concentración espermática por mL (436.0 vs. 338.5×10<sup>6</sup> células espermáticas mL<sup>-1</sup>) y total (6.3 vs. 5.0×10<sup>10</sup> células espermáticas; Estienne y Harper, 2000).

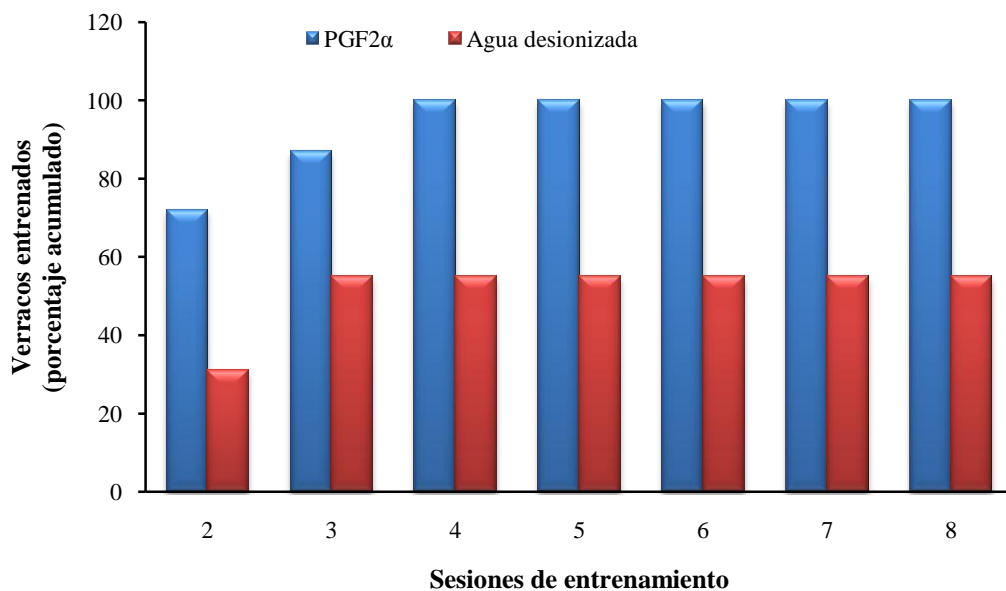


Figura 46. Porcentaje acumulativo de verracos que fueron tratados con PGF<sub>2α</sub> o agua desionizada y que fueron entrenados para montar una cerda artificial para la colección de semen en cada sesión. Adaptado de: Estienne y Harper (2000).

En otros estudios realizados con verracos maduros con experiencia sexual y bajo libido (natural o inducido), se ha reportado que la aplicación de PGF<sub>2α</sub> restablece la libido, normaliza el tiempo de reacción (Szurop *et al.*, 1985) y reduce el número de montas falsas (Estienne *et al.*, 2004; Cuadro 6). Lo anterior al parecer se debe a que la PGF<sub>2α</sub> incrementa los niveles de testosterona y estradiol en cerdos con bajos niveles de estas hormonas (Estienne *et al.*, 2004).

Cuadro 6. Concentración de hormonas y comportamiento sexual de verracos con implante simulado más aplicación de solución salina, implante con un agonista de GnRH (GnRHa) más aplicación de solución salina e implante de GnRHa tratados con PGF<sub>2α</sub>.

	<i>Simulación</i> + <i>Sol. Salina</i>	<i>GnRHa</i> + <i>Sol. Salina</i>	<i>GnRHa</i> + <i>PGF<sub>2α</sub></i>
Testosterona, ng mL <sup>-1</sup>	2.12 <sup>a</sup>	-0.18 <sup>b</sup>	1.60 <sup>a</sup>
Estradiol, pg mL <sup>-1</sup>	309.2 <sup>a</sup>	22.0 <sup>b</sup>	272.8 <sup>a</sup>
Tiempo de reacción, s	398.0	499.4	292.1
De la inyección a la eyaculación, s	454.9	519.6	395.3
Duración de la eyaculación, s	276.3	265.9	498.0
Montas falsas	1.6 <sup>a</sup>	4.2 <sup>b</sup>	-0.4 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores con superíndice diferentes indican diferencias estadísticas (P<0.05). Fuente: Estienne *et al.* (2004).

Adicionalmente se ha observado que la aplicación de PGF<sub>2α</sub> provoca en los cerdos desde una leve reacción de tipo alérgico al usar bajas concentraciones de esta hormona (5 o 10 mg; Lutalyse®) caracterizada por comezón en cara y cuello, hasta vómito con dosis elevadas (20 mg; Lutalyse®; Kozink *et al.*, 2002).

## 5. Literatura citada

- Abayasekara, D.R.E., and D.C. Wathes. 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 61(5): 275-287.
- Adam, O., and G. Wolfram, 1984. Effect of different linoleic acid intakes on prostaglandin biosynthesis and kidney function in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 763-770.
- Adamczak, M., W.T. Bornscheuer, and W. Bednarski. 2008. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 491-504.
- Adjei, A.A., and S. Yamamoto. 1995. A dietary nucleoside-nucleotide mixtures inhibits endotoxin-induced bacterial translocation in mice fed protein free diet. *J. Nutr.* 125: 42-48.
- Adjei, A.A., K. Yamauchi, Y.C. Chan, M. Konishi, and S. Yamamoto. 1996. Comparative effects of dietary nucleoside-nucleotide mixture and its components on endotoxin induced bacterial translocation and small intestine injury in protein deficient mice. *Gut* 38: 531-537.
- Agatha, G., A. Voigt, E. Kauf, and F. Zintl. 2004. Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. *Cancer Lett.* 209: 87-103.
- Ainsworth, L., R.D. Baker, and D.T. Armstrong. 1975. Preovulatory changes in follicular fluid prostaglandins F in swine. *Prostaglandins* 9(6): 915-925.
- Aitken, R.J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fert. Develop.* 7: 659-668.
- Akahoshi, A., K. Koba, S. Ohkura-Kaku, N. Kaneda, C. Goto, H. Sano, T. Iwata, Y. Yamauchi, K. Tsutsumi, and M. Sugano. 2003. Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats. *Nutr. Res.* 23: 1691-1701.
- Albers, R., R.P.J. van der Wielen, E.J. Brink, H.F.J. Hendriks, V.N. Dorovska-Taran, and I.C.M. Mohede. 2003. Effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomer on immune function in healthy men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57: 595-603.
- Am-in, N., W. Tantasuparuk, and M. Techakumphu. 2010. Comparison of artificial insemination with natural mating on smallholder farms in Thailand, and the effects of boars stimulation and distance of semen delivery on sow reproductive performance. *Trop. Anim. Health Prod.* 42(5): 921 – 924.
- Ando, A., J. Ogawa, S. Sugimoto, S. Kishino, E. Sakuradani, K. Yokozeki, and S. Shimizu. 2009. Selective production of *cis*-9, *trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid from *trans*-vaccenic acid methyl ester by *Delacroixia coronata*. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1697-1704.
- Animot-Gilchrist, D.V., and H.D.I. Anderson. 2004. Insulin resistance-associated cardiovascular disease: potential benefits of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(Suppl.): 1159S-1163S.

- Arab. K., A. Rossary, L. Soulère, and J.P. Steghens. 2006. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Br. J. Nutr.* 96: 811-819.
- Arbonés-Mainar, J.M., M.A. Navarro, M.A. Guzmán, C. Arnal, J.C. Surra, S. Acín, R. Carnicer, J. Osada, and H.M. Roche. 2006a. Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E. Knockout mice. *Atherosclerosis* 189: 318-327.
- Arbonés-Mainar, J.M., M.A. Navarro, S. Acín, M.A. Guzmán, C. Arnal, J.C. Surra, R. Carnicer, H.M. Roche, and J. Osada. 2006b. *Trans*-10, *cis*-12- and *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid isomers selectively modify HDL-apolipoprotein composition in apolipoprotein E Knockout mice. *J. Nutr.* 136: 353-359.
- Armstrong, D. T., and J. Zamecnik. 1975. Preovulatory elevation of rat ovarian prostaglandin F and its blockade of indomethacin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2: 125-131.
- Arosh, J.A., S.K. Banu, P. Chapdelaine, E. Madore, J. Sirois, and M.A. Fortier. 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 145: 2551-2560.
- Auletta, F.J., and A.P.F. Flint. 1988. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhuman primates, and women especially in relation to the time of luteolysis. *Endocr. Rev.* 9: 88-105.
- Averette-Gatlin, L., M.T. See, D.K. Larick, X. Lin, and J. Odle. 2002. Conjugated linoleic acid in combination with supplemental dietary fat alters pork fat quality. *J. Nutr.* 132: 3105-3112.
- Axelsson, I., C.E. Flodmark, N. Räihä, M. Tacconi, M. Visentin, I. Minoli, G. Moro, and A. Warm. 1997. The influence of dietary nucleotides on erythrocyte membrane fatty acids and plasma lipids in preterm infants. *Acta Pædiatr.* 86: 539-544.
- Aydin, R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29: 189-195.
- Azain, M.J., D.B. Hausman, M.B. Sisk, W.P. Flatt, and D.E. Jewell. 2000. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather cell number. *J. Nutr.* 130: 1548-554.
- Azain, M.J., and F. Chi. 2001. The anti-obese effects of conjugated linoleic acid in the rat are accounted for by the *trans*-10, *cis*-12 isomer, but are gender dependent. *Proc. Nutr. Soc.* 60: 214A (Abstr.).
- Azain, M.J. 2003. Conjugated linoleic acid and its effects on animal products and health in single-stomached animals. *Proc. Nutr. Soc.* 63: 319-328.
- Azain, M.J. 2004. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J. Anim. Sci.* 82: 916-924.

- Banni, S., E. Angioni, V. Casu, M.P. Melis, G. Carta, F.P. Corongiu, H. Thompson, and C. Ip. 1999. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 20 (6): 1019-1024.
- Bassaganya-Riera, J., R. Hontecillas-Magarzo, K. Bregendahl, M.J. Wannemuehler, and D.R. Zimmerman. 2001a. 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.* 79: 714-721.
- Bassaganya-Riera J., R. Hontecillas, D.R. Zimmerman, and M.J. Wannemuehler. 2001b. Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *J. Nutr.* 131: 2370-2377.
- Basu, S., A. Smedman, and B. Vessby. 2000. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett.* 468: 33-36.
- Bauman, D.E., L.H. Baumgard, B.A. Corl, and J.M. Griinari. 1999. Biosynthesis of the conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* E30: 1-15.
- Bee, G. 2001. Dietary conjugated linoleic acids affect tissue lipid composition but not *de novo* lipogenesis in finishing pigs. *Anim. Res.* 50: 383-399.
- Bell, J.A., J.M. Griinari and J.J. Kennelly. 2006. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89: 733-748.
- Belury, M.A., K.P. Nickel, C.E. Bird, and Y. Wu. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr. Cancer* 26:149-157.
- Belury, M.A., and A. Kempa-Steczko. 1997. Conjugated linoleic acid modulated hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32(2): 199-204.
- Belury, M.A. 2002. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanism of action. *J. Nutr.* 132: 2995-2998.
- Benito, P., G.L. Nelson, D.S. Kelley, G. Bartolini G, P.C. Schmidt, and V. Simon V. 2001. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 36(3): 229-236.
- Beppu, F., M. Hosakawa, L. Tonaka, H. Kohno, T. Tanaka, and K. Miyashita. 2006. Potent inhibitory effect of *trans*9, *trans*11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 17: 830-836.
- Berdeaux, O., W.W. Christie, F.D. Gunstone, and J.L. Sebedio. 1997. Large-scale synthesis of methyl *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoate from methyl ricinoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(8): 1011-1015.
- Berdeaux, O., L. Voinot, E. Angioni, P. Juanéda, and J.L. Sébédio. 1998. A simple method of preparation of methyl *trans*-10, *cis*-12 and *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoates from methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1749-1755.



- Berven, G., A. Bye, O. Hals, H. Blankson, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein, and O. Gudmundsen. 2000. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 455-462.
- Bessa, R.J.B., J. Santos-Silva, J.M.R. Ribeiro, and A.V. Portugal. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest. Prod. Sci.* 63: 201-211.
- Blankson, H., J.A. Stakkestad, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein, and O. Gudmundsen. 2000. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr.* 130: 2943-2948.
- Blesbois, E., V. Douard, M. Germain, and P. Boniface. 2004. Effect of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology* 61: 537-549.
- Botelho, A.P., L.F. Santos-Zago, and A.C. Oliveira. 2008. Conjugated linoleic acid supplementation modified the body composition and serum leptin levels in weaning rats. *Arch. Lat. Nutr.* 58(2): 156-163.
- Boza, J., J. Jiménez, M.J. Faus, and A. Gil. 1992. Influence of postnatal age and dietary nucleotides on plasma fatty acids in the weanling rat. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 16: 322-326.
- Brandebourg, T.D., and C.Y. Hu. 2005. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. *J. Anim. Sci.* 83: 2096-2105.
- Brodie, A.E., V.A. Manning, K.R. Ferguson, D.E. Jewell, and C.Y. Hu. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J. Nutr.* 129: 602-606.
- Bronk, J.R., and J.G. Hastewell, 1987. The transport of pyrimidines into tissue rings cut from rat small intestine. *J. Physiol.* 382: 475-488.
- Brown, J.M., and M.K. McIntosh. 2003. Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J. Nutr.* 133: 3041-3046.
- Brown, J.M., M.S. Boysen, S. Chung, O. Fabiyi, R. Morrison, S. Mandrup, and M. McIntosh. 2004. Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine and paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *J. Biol. Chem.* 279: 26735-26747.
- Bueno, J., M. Torres, A. Almendros, R. Carmona, M.C. Nunez, A. Rios, and A. Gil. 1994. Effects of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea. Histological and ultrastructural changes. *Gut* 35: 926-933.
- Burcelin, R., S. Kamohara, J. Li, G.S. Tannenbaum, M.J. Charron, and J.M. Friedman. 1999. Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in *ob/ob* mice. *Diabetes* 48: 1264-1269.
- Cantwell, H., R. Devery, M. O'Shea, and C. Stanton. 1999. The effect of conjugated linoleic acid on the oxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids* 34(8): 833-839.

- Carver, J.D., B. Pimentel, W.I. Cox, and L.A. Barness. 1991. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics* 88(2): 359-363.
- Carver, J.D. 1994. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. *J Nutr.* 124: 144S-148S.
- Carver, J.D. 1999. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Pædiatr.* 88(9; suppl. 430): 83-88.
- Carver, J.D., and W.A. Walker, 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 6: 58-72.
- Cerolini, S., A. Maldjian, P. Surai, and R. Noble. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 99-111.
- Cesano, A., S. Visonneau, J.A. Scimeca, D. Kritchevsky, and D. Santoli. 1998. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res.* 18: 833-838.
- Changhua, L., Y. Jindong, L. Defa, Z. Lidan, Q. Shiyan, and X. Jianjun. 2005. Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *J Nutr.* 135: 239-244.
- Chen, Z.Y., P.T. Chan, K.Y. Kwan, and A. Zhang. 1997. Reassess of the antioxidant activity of conjugated linoleic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 749-753.
- Cheng, W.L., C.K. Lii, H.W. Chen, T.H. Lin, and K.L. Liu. 2004. Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J. Agric. Food Chem.* 52(1): 71-78.
- Cherian, G., T.B. Holsonbake, M.P. Goeger, and R. Bildfell. 2002. Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids* 37(8): 751-757.
- Cherian, G., and M.P. Goeger. 2004. Hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens fed CLA or n-3 fatty acids. *Lipids* 39(1): 31-36.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2000. Effects of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70(1-2): 31-48.
- Chin, S.F., W. Lui, J.M. Storkson, Y.L. Ha, and M.W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5: 185-197.
- Choi, Y., Y. Kim, Y. Han, Y. Park, M. Pariza, and J. Ntambi. 2000. The *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 130: 1920-1924.
- Choi, J.S., I.U. Koh, M.H. Jung, and J. Song. 2007. Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signaling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 98: 264-275.

- Christie, W.W., G. Dobson, and F.D. Gunstone. 1997. Isomers of commercial samples of conjugated linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74(11): 1231.
- Chung, S., J.M. Brown, M.B. Sandberg, and M. McIntosh. 2005. *Trans*-10, *cis*-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling. *J. Lipid Res.* 46: 885-895.
- Churruga, I., A. Fernández-Quintela, A. Zabala, M.T. Macarulla, V. Navarro, V.M. Rodríguez, E. Simón, F. Milagro, and M.P. Portillo. 2007. The effect of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on lipogenesis is tissue dependent in hamsters. *Genes Nutr.* 2: 121-123.
- Churruga, I., A. Fernández-Quintela, and M.P. Portillo. 2009. Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. *BioFactors.* 35(1): 105-111.
- Clément L., H. Poirier, I. Niot, V. Bocher, M. Guerre-Millo, S. Krief, B. Staels, and P. Besnard. 2002. Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J. Lipid Res.* 43: 1400-1409.
- Collomb, M., U. Bütikofer, R. Sieber, J.O. Bosset, and B. Jeangros. 2001. Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cows' milk fat produced in lowlands and highlands. *J. Dairy Res.* 68: 519-523.
- Collomb, M., A. Schmid, R. Sieber, D. Wechsler, and E.L. Ryhänen. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: variations and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16: 1347-1361.
- Cook, M.E., C.C. Miller, Y. Park, and M. Pariza. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72: 1301-1305.
- Corino, C., J. Mourot, S. Magni, G. Pastorelli, and F. Rosi. 2002. Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J. Anim. Sci.* 180: 1020-1028.
- Corino, C., S. Magni, G. Pastorelli, R. Rossi, and J. Mourot. 2003. Effects of conjugated linoleic acid on meat quality, lipid metabolism, and sensory characteristics of dry-cured hams from heavy pigs. *J. Anim. Sci.* 81: 2219-2229.
- Corino, C., A.D. Giancamillo, R. Rossi, and C. Domeneghini. 2005. Dietary conjugated linoleic acid affects morphofunctional and chemical aspects of subcutaneous adipose tissue in heavy pigs. *J. Nutr.* 135: 1444-1450.
- Corino, C., M. Musella, G. Pastorelli, R. Rosi, K. Paolone, L. Constanza, A. Manchisi, and G. Maiorano. 2008. Influences of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and total lysine content on growth, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs. *Meat Sci.* 79(2): 307-316.
- Corl, B.A., S.A. Mathews Oliver, X. Lin, W.T. Oliver, Y. Ma, R.J. Harrel, and J. Odle. 2008. Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenetic gene expression in neonatal pigs fed low- or high-fat formulas. *J. Nutr.* 138: 449-454.

- Cosgrove, M. 1998. Nucleotides. *Nutrition* 14(1): 748-751.
- Dauchy, R.T., E.N. Dauchy, L.A. Sauer, D.E. Blask, L.K. Davison, J.A. Krause, and D.T. Lynch. 2004. Differential inhibition of fatty acid transport in tissue isolated steroid receptor negative human breast cancer xenografts perfused in situ with isomer of conjugated linoleic acid. *Cancer Lett.* 209(1): 7-15.
- de Deckere, E.A.M, J.M.M. van Amelsvoort, G.P. McNeill, and P. Jones. 1999. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.* 82: 309-317.
- de Jonge, H.W., D.H. Dekkers, and J.M. Lamers. 1996. Polyunsaturated fatty acids and signalling via phospholipase C beta and A<sub>2</sub> in myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 157: 199-210.
- de Oliveira, S.L., E.T. Fialho, L.D. Solis, J.A. de Freitas, R.T. Fonseca, and M.G. Zangeronimo. 2006. The effect of the inclusion of different types of oil in the diet of boars on the quality of semen in natura. *Ciênc. Agrotec. Lavras* 30(6): 1205-1210.
- de Roos, B., I. Duivenvoorden, G. Rucklidge, M. Reid, K. Ross, R.J. A.N. Lamers, P.J. Voshol, L.M. Havekes, and B. Teusink. 2005a. Response of apolipoprotein E\*3-Leiden transgenic mice to dietary fatty acids: combining liver proteomics with physiological data. *FASEB J.* 19: 813-815.
- de Roos, B., G. Rucklidge, M. Reid, K. Ross, G. Duncan, M.A. Navarro, J.M. Arbones-Mainar, M.A. Guzman-Garcia, J. Osada, J. Browne, C.E. Loscher, and H.M. Roche. 2005b. Divergent mechanisms of *cis*9, *trans*11-and *trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach. *FASEB J.* 19: 1746-1748.
- Degrace, P., L. Demizieux, J. Gresti, J.M. Chardigny, J.L. Sébédio, and P. Clouet. 2003. Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed *trans*-10, *cis*-12 linoleic acid. *FEBS Lett.* 546: 335-339.
- Degrace, P., L. Demizieux, J. Gresti, J.M. Chardigny, J.L. Sébédio, and P. Clouet, 2004. Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6j mice fed *trans*-10, *cis*-12-isomer of linoleic acid. *J. Nutr.* 134: 861-867.
- DeLany, J.P., F. Blohm, A.A. Truett, J.A. Scimeca, and D.B. West. 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 276: 1172-1179.
- DeLany, J.P., and D.B. West. 2000. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *J. Am. Coll. Nutr.* 19(4): 487S-493S.
- DeLucchi, C., M.L. Pita, M.J. Faus, J.A. Molina, R. Uauy, and A. Gil. 1987. Effects of dietary nucleotides on fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 6: 568-574.
- Devery, R. A. Miller, and C. Stanton. 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 29(2): 341-344.

- Dhiman, T.R., E.D. Helmink, D.J. McMahon, R.L. Fife, and M.W. Pariza. 1999a. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *J. Dairy Sci.* 82: 412-419.
- Dhiman, T.R., K.C. Olson, I.S. MacQueen, and M.W. Pariza. 1999b. Conjugated linoleic acid content of meat from steers fed soybean oil. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):84 (Abstr.).
- Dhiman, T.R., L.D. Satter, M.W. Pariza, M.P. Galli, K. Albright, and M.X. Tolosa. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic acid and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83: 1016-1027.
- Dhiman, T.R., S. Nam, and A.L. Ure. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45: 463-482.
- Du, M., D.U. Ahn, K.C. Nam, and J.L. Sell. 2000. Influence of dietary conjugated linoleic acid on volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. *Meat Sci.* 56: 387-395.
- Dugan, M.E.R., J.L. Aalhus, A.L. Schaefer, and J.K.G. Kramer. 1997. The effects of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 77: 723-725.
- Dugan, M.E.R., J.L. Aalhus, K.A. Lien, A.L. Schafer, and J.K.G. Kramer. 2001. Effects of feeding different levels of conjugated linoleic acid and total oil to pigs on live animal performance and carcass composition. *Can. J. Anim. Sci.* 81: 505-510.
- Dumke, C.L., A.C. Gazdag, K. Fechner, Y. Park, M.W. Pariza, and G.D. Cartee. 2000. Skeletal muscle glucose transport in conjugated linoleic acid (CLA) fed mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: S226 (Abstr.).
- Dunsha, F.R., D.N. D'Souza, D.W. Pethick, G.S. Harper, and R.D. Warner. 2005. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. *Meat Sci.* 71: 8-38.
- Durgam, V.R., and G. Fernandes. 1997. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.* 116: 121-130.
- Eggert, J.M., A.L. Carroll, B.T. Richert, D.E. Gerrard, J.C. Forrest, B.C. Bowker, E.J. Wynveen, J.E. Hammelman, and A.P. Schinckel. 1999. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) on the growth carcass composition and pork quality of two genotypes of lean gilts. *J. Anim. Sci.* 77(suppl. 1): 178 (Abstr.).
- Eggert, J.M., M.A. Belury, A. Kempa-Steczko, S.E. Mills, and A.P. Schinckel. 2001. Effects of conjugated linoleic acid on the belly firmness and fatty acid composition of genetically lean pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 2866-2872.
- Espey, L.L., V.I. Stein, and J. Dumitrescu. 1982. Survey of anti-inflammatory agents and related drugs as inhibitors of ovulation in the rabbit. *Fertil. Steril.* 38: 238-247.
- Estienne, M.J., and A.F. Harper. 2000. PGF<sub>2α</sub> facilitates the training of sexual active boars for semen collection. *Theriogenology* 54:1087-1092.

- Estienne, M.J., D.S. Broughton, and C.R. Barb. 2000. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth hormone, testosterone, estradiol, and leptin in boars treated with n-methyl-D,L-aspartate. *J. Anim. Sci.* 78: 365-370.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, and C.E. Babb. 2001. Lutalyse enhances libido in boars being trained to mount an artificial sow for semen collection. *J. Anim. Sci.* 79 (Suppl. 2): 21 (Abstr.).
- Estienne, M.J., and A.F. Harper. 2004. Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with PGF<sub>2α</sub>. *J. Anim. Sci.* 82: 1494-1498.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, J.W. Knight, C.R. Barb, and G.B. Rampacek. 2004. Sexual behavior after treatment with prostaglandin-F<sub>2α</sub> in boars with suppressed concentrations of gonadal steroids. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 89: 53-57.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, W.E. Beal, and R.J. Crawford. 2007. Effects of prostaglandins and prostaglandin synthesis inhibitors on sexual behavior in boars. *Reprod. Biol.* 72(2): 163-175.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, and R.J. Crawford. 2008. Dietary supplementation with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. *Theriogenology* 70: 70-76.
- Eulitz, K., M.P. Yurawecz, N. Sehat, J. Fritsche, J.A.G. Roach, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, R.O. Adlof, and Y. Ku. 1999. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical *cis/trans* conjugated linoleic acid isomers 8,10-through 11,13-18:2. *Lipids* 34(8): 873-877.
- Evans, M., C. Geigerman, J. Cook, L. Curtis, B. Kuebler, and M. McIntosh. 2000. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 35(8): 899-910.
- Evans, M., Y. Park, M. Pariza, L. Curtis, B. Kuebler, and M. McIntosh. 2001. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 36(11): 1223-1232.
- Evans, M.E., J.M. Brown, and M.K. McIntosh. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem.* 13: 508-516.
- Eyjolfson, V., L.L. Spriet, and D.J. Dyck. 2004. Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36(5): 814 (Abstr.).
- Fagali, N., and A. Catalá. 2008. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomer, linoleic and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophys. Chem.* 137(1): 56-62.
- Flintoff-Dye, N.L., and S.T. Omaye. 2005. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. *Nutr. Res.* 25: 1-12.

- Floris, R., R. Dekker, C. Slangen, and G. Ellen. 2006. Influence of pasture feeding and stall feeding on CLA and other fatty acids in bovine milkfat. *Aust. J. Dairy Technol.* 61(1): 13-20.
- Fonda, E.S., J.R. Diehl, C.R. Barb, T.E. Kiser, R.R. Kraeling, and G.B. Rampacek. 1981. Serum luteinizing hormone, testosterone, prolactin and cortisol concentrations after PGF<sub>2α</sub> in the boar. *Prostaglandins* 21(6): 933-943.
- Fontana, L., E. Moreira, M.I. Torres, I. Fernández, A. Rios, F. Sánchez de Medina and A. Gil. 1998. Dietary nucleotides corrected plasma and liver microsomal fatty acid alteration in rats with liver cirrosis induced by oral intake of thioacetamide. *J. Hepatol.* 28: 662-669.
- Fontbonne, A.M., and E.M. Eschwege. 1991. Insulin and cardiovascular disease: Paris prospective study. *Diabetes Care* 14: 461-469.
- Frandsen, R.D., y T.L. Spurgeon. 1995. *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos*. 5ta. ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 560 pp.
- Fritsche, S., and J. Fritsche. 1998. Occurrence of conjugated linoleic acid isomers in beef. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 75(10): 1449-1451.
- Fritsche, J., S. Fritsche, M.B. Solomon, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz, K. Morehouse, and Y. Ku. 2000. Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers in beef fat. *Eur. J. Lip. Sci. Technol.* 102: 667-672.
- Gavino, V.C., G. Gavino, M.J. Leblanc, and M. Tuchweber, 2000. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J. Nutr.* 130: 27-29.
- Gebauer, S.K., T.L. Psota, and P.M. Kris-Etherton. 2007. The diversity of health effects of individual *trans* fatty acids isomers. *Lipids* 42: 787-799.
- Gil, A., E. Corral, A. Martinez, and J.A. Molina. 1986. Effects of the addition of nucleotides to an adapted milk formula on the microbial pattern of faeces in at-term newborn infants. *J. Clin. Nutr. Gastroenterol.* 1: 127-132.
- Goli, S.A.H., M. Kadivar, J. Keramat, and M. Fazilati. 2008. Conjugated linoleic acid (CLA) production and lipase-catalyzed interesterification of purified CLA with canola oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 400-404.
- Gonçalves, X.E., F. Rutz, y P. Rossi. 2005. Uso de una fuente rica en nucleótidos, proteínas e inositol (NuPro<sup>MR</sup>) en dietas para cerdos. *Proc. Alltech's 21th Annual Symposium*. Lexington, Kentucky, USA. pp. 49-61.
- Goodwin, J.S., and J. Ceuppens. 1983. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J. Clin. Immunol.* 3(4): 295-315.
- Göttsche, J.R., and E.M. Straarup. 2006. Fatty acid profiles in tissue of mice fed conjugated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 468-478.

- Griinari, J.M., and D.E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminant. In: Yurawecz, M.P., M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, and G.J. Nelson (eds.). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. AOCS Press. Champaign, IL. pp. 180-200.
- Grimble, G.K., and O.M. Westwood. 2001. Nucleotides as immunomodulators in clinical nutrition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4(1): 57-64.
- Grundy, S.N., and M.A. Denke. 1990. Dietary influence on serum lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.* 31: 1149-1172.
- Ha, Y.L., N.K., Grimm and M.W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.
- Ha, Y.L., N.K. Grimm, and M.W. Pariza. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification in natural and processed cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 37(1): 75-81.
- Ha, Y.L., J. Storkson, and M.W. Pariza. 1990. Inhibition of benz(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50: 1097-1101.
- Halade, G.V., Md.M. Rahman, and G. Fernandes. 2010. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57BI/6j mice. *J. Nutr. Biochem.* 21(4): 332-337.
- Hamura, M., H. Yamatoya, and S. Kudo. 2001. Glycerides rich in conjugated linoleic acid (CLA) improve blood glucose control in diabetic C57BLKS-Lepr<sup>db</sup>/lepr<sup>db</sup> mice. *J. Oleo Sci.* 50(11): 889-894.
- Harfoot, C.G., and G.P. Hazlewood. 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. (ed.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science. New York. pp. 285-321.
- Hargrave, K.M., B.J. Meyer, C. Li, M.J. Azain, C.A. Baile, and J.L. Miner. 2004. Influence of dietary conjugated linoleic acid and fat source on body fat and apoptosis in mice. *Obes. Res.* 12(9): 1435-1444.
- Hawkes, J.S., R.A. Gibson, D. Robertson, and M. Makrides. 2006. Effect of dietary nucleotide supplementation on growth and immune function in term infants: a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60: 254-264.
- Hayek, M.G., S.N. Han, D. Wu, B.A. Watkins, M. Meydani, J.L. Dorsey, D.E. Smith, and S.N. Meydani. 1999. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. *J. Nutr.* 32: 32-38.
- Hemsworth, P.H., and A.J. Tilbrook. 2007. Sexual behavior of male pigs. *Horm. Behav.* 52(1):39-44.



- Henderson, T.R., M. Hamosh, N.R. Mehta, P.A. Angelus, and P. Hamosh. 1994. Red blood cell (RBC) phospholipid (PL) docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) concentrations in very low birth weight (VLBW) infants are not affected by nucleotide supplementation (NS) of PREEMIE formula (F) and are lower than in mother's own milk (MOM) fed infants. *Pediatr. Res.* 35: 313A.
- Henriksen, E.J., M.K. Teachey, Z.C. Taylor, S. Jacob, A. Ptock, K. Krämer, and O. Hasselwander. 2003. Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E98-E105.
- Ho, C.Y., K.V. Miller, D.A. Saviano, R.T. Crane, K.A. Erickson, and A.J. Clifford. 1979. Absorption and metabolism of orally administered purines in fed and fasted rats. *J. Nutr.* 109: 1377-1382.
- Hockenbery, M., G. Nuñez, C. Millman, R.D. Schreiber, and S.J. Korsmeyer. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348(6299): 334-336.
- Houseknecht, K.L., J.P.V. Heuvel, S.Y. Moya-Camarena, C.P. Portocarrero, L.W. Peck, K.P. Nickel, and M.A. Belury. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fa/fa* rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224(3): 678-682.
- Hur, S.J., B.W. Ye, J.L. Lee, Y.L. Ha, G.B. Park, and S.T. Joo. 2004. Effects of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage. *Meat Sci.* 66: 771-775.
- Hur, S.J., G.B. Park, and S.T. Joo. 2007. A comparison of the effects of dietary conjugated linoleic acid contents, cholesterol, lipid oxidation and drip loss in pork loin and chicken breast. *J. Muscle Foods* 18: 264-275.
- Iacono, J.M., and R.M. Dougherty. 1993. Effects of polyunsaturated fats on blood pressure. *Ann. Rev. Nutr.* 13: 243-260.
- Igarashi, M., and T. Miyazawa. 2000. Do conjugated eicopentaenoic acid and conjugated docosahexaenoic acid induce apoptosis via lipid peroxidation in cultured human tumor cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 649-656.
- Igarashi, M., and T. Miyazawa. 2001. The growth inhibitory of conjugated linoleic acid on human hepatoma cell line, HepG2, is induced by change in fatty acid metabolism, but not in facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1530: 162-171.
- Inoue, N., K. Nagao, J. Hirata, Y.M. Wang, and T. Yanagita. 2004. Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 679-684.

- Inskeep, E.K., and W.J. Murdoch. 1980. Relation of ovarian functions to uterine and ovarian secretions of prostaglandins during the oestrus cycle and early pregnancy in the ewe and cow. In: Greep, R.O. (ed.). *Reproductive Physiology III. International Review of Physiology*. University Park Press, Baltimore, M.D. 22: 325-356.
- Intarapichet, K.O., B. Maikhunthod, and N. Thungmanee. 2008. Physicochemical characteristics of pork fed palm oil and conjugated linoleic acid supplements. *Meat Sci.* 80: 788-794.
- Ip, C., S.F. Chin, J.A. Scimeca, and M.W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51: 6118-6124.
- Ip, C., M. Singh, H.J. Thompson, and J.A. Scimeca. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54: 1212-1215.
- Ip, C., S.P. Briggs, A.D. Haegeler, H.J. Thompson, J. Storkson, and J.A. Scimeca. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17(5): 1045-1050.
- Ip, C., M.M. Ip, T. Loftus, S. Shoemaker, and W. Shea-Eaton. 2000. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesion of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 689-696.
- Ip, C., Y. Dong, H.J. Thompson, D.E. Bauman, and M.M. Ip. 2001. Control of rat mammary epithelium proliferation by conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer* 39(2): 233-238.
- Ip, M.M., P.A. Masso-Welch, and C. Ip. 2003. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: role of the stroma and the epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8(1): 103-118.
- Jackson, C.D., C. Weis, B.J. Miller, and S.J. James. 1997. Dietary nucleotides: effects on cell proliferation following partial hepatectomy in rats fed NIH-31, AIN-76A, or folate/methyl-deficient diets. *J. Nutr.* 127: 834S-837S.
- Jain, V.P., and A. Proctor. 2006. Photocatalytic production and processing of conjugated linoleic acid-rich soy oil. *J. Agric. Food. Chem.* 54(15): 5590-5596.
- Jain, V.P., and A. Proctor. 2007. Kinetics of photoirradiation-induced synthesis of soy oil-conjugated linoleic acid isomers. *J. Agric. Food Chem.* 55(3): 889-894.
- Jain, V.P., A. Proctor, and R. Lall. 2008. Pilot-scale production of conjugated linoleic acid-rich soy oil by photoirradiation. *J. Food Sci.* 73(4): E183-E192.
- Jiménez, J., J. Boza Jr., M.D. Suárez, and A. Gil. 1992. Changes in fatty acid profiles of red blood cell membranes mediated by dietary nucleotides in weanling rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 14: 293-299.
- Jones, P. M., and S.J. Persaud. 1993. Arachidonic acid as a second messenger in glucose-induced insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Endocrinol.* 137: 7-14.

- Joo, S.T., J.I. Lee, Y.L. Ha, and G.B. Park. 2002. Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition, lipid oxidation, color, and water-holding capacity of pork loin. *J. Anim. Sci.* 80: 108-112.
- Jourdan, T., L. Djaouti, L. Demizieux, J. Gresti, B. Vergès, and P. Degrace. 2009. Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by *trans*-10, *cis*-12, conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 139: 1901-1907.
- Kaeoket, K. 2006. The effect of dose and route of administration of R-cloprostenol on the parturient response of sows. *Reprod. Dom. Anim.* 41(5): 472-476.
- Kamohara, S., R. Burcelin, J.L. Halaas, J.M. Friedman, and M.J. Charron, 1997. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377.
- Kang, K., and M.W. Pariza. 2001. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid reduces leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287(2): 377-382.
- Kang, J.H., G.S. Lee, E.B. Jeung, and M.P. Yang. 2007. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid increases phagocytosis of porcine peripheral blood polymorphonuclear cells in vitro. *Br. J. Nutr.* 97:117-125.
- Kang, J.H., G.S. Lee, E.B. Jeung, and M.P. Yang. 2009. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid modulated phagocytic responses of canine peripheral blood polymorphonuclear neutrophilic leukocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin B. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130: 178-186.
- Kelly, M.L., J.R. Berry, D.A. Dwyer, J.M. Griinari, P.Y. Chouinard, M.E. Van Amburgh, and D.E. Bauman. 1998a. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128: 881-885.
- Kelly, M.L., E.S. Kolver, D.E. Bauman, M.E. Van Amburgh, and L.D. Muller. 1998b. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 1630-1636.
- Kelley, D.S., J.M. Warren, V.A. Simon, G. Bartolini, B.E. Mackey, and K.L. Erickson. 2002. Similar effects of *c*9, *t*11-CLA and *t*10, *c*12-CLA on immune cell functions in mice. *Lipids* 37(7): 725-728.
- Kelley, D.S., and K.L. Erickson. 2003. Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal model: benefits vs. risks. *Lipids* 38(4): 377-386.
- Kelley, D.S., G.L. Bartolini, J.W. Newman, M. Vemuri, and B.E. Mackey. 2006. Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing *t*10, *c*12-, and *c*9, *t*11-conjugated linoleic acid. *Prostaglandins, Leukotr. Essent. Fatty Acids* 74: 331-338.
- Kelsey, J.A., B.A. Corl, R.J. Collier, and D.E. Bauman. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 2588-2597.

- Kemp, M.Q., B.D. Jeffy, and D. Romagnolo. 2003. Conjugated linoleic acids inhibits cell proliferation through a p53-dependent mechanism: effects on the expression of G1-restriction points in breast and colon cancer cells. *J. Nutr.* 133: 3670-3677.
- Kepler, C.R., K.P. Hirons, J.J. McNeill, and S.B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241(6): 1350-1354.
- Kim, Y.J., R.H. Liu, D.R. Bond, and J.B. Russell. 2000. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5226-5230.
- Kim, Y.J., R.H. Liu, J.L. Rychlik, and J.B. Russell. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* 92: 976-982.
- Kim, Y.J., K.W. Lee, and H.J. Lee. 2004. Total antioxidant capacity of arginine-conjugated linoleic acid (CLA) complex. *J. Agric. Food Chem.* 53(3): 439-444.
- Kim, E.J., H.K. Shin, J.S. Cho, S.K. Lee, M.H. Won, J.W. Kim, and J.H.Y. Park. 2006. *trans*10, *cis*12 conjugated linoleic acid inhibits the G1-S cell cycle progression in DU145 human carcinoma cells. *J. Med. Food.* 9(3): 293-299.
- King, D.A., J.M. Behrends, B.E. Jenschke, R.D. Rhoades, and S.B. Smith. 2004. Positional distribution of fatty acid in triacylglycerols from subcutaneous adipose tissue of pigs fed diets enriched with conjugated linoleic acid, corn oil, or beef tallow. *Meat Sci.* 67: 675-681.
- Kishino, S., J. Ogawa, Y. Omura, K. Matsumura, and S. Shimizu. 2002. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 159-163.
- Kliwer, S.A., S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, G.B. Wisey, C.S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T.M. Willson, J.M. Lenhard, and J.M. 1997. Lehmann. Fatty acid and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 29: 94(9): 4318-4323.
- Kozink, D.M., M.J. Estienne, A.F. Harper, and J.W. Knight. 2002. The effect of lutalyse on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. *Theriogenology* 58:1039-1045.
- Kraft, J., M. Collomb, P. Möckel, R. Sieber, and G. Jahreis. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* 38(6): 657-664.
- Kramer, J.K.G., N. Sehat, M.E.R. Dugan, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz, J.A.G. Roach, K. Eulitz, J.L. Aalhus, A.L. Schaefer, and Y. Ku. 1998. Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 33(6): 549-558.

- Kritchevsky, D., S.A. Tepper, S. Wright, P. Tso, and S.K. Czarnecki. 2000. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J. Am. Coll. Nutr.* 19(4): 472S-477S.
- Kritchevsky, D., S.A. Tepper, S. Wright, and S.K. Czarnecky. 2002. Influence of graded level of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. *Nutr. Res.* 22: 1275-1279.
- Kuehl, Jr., F.A., and R.W. Egan. 1980. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science* 210: 978-984.
- Kulkarni, A.D., W.C. Fanslow, F.B. Rudolph, and C.T. Van Buren. 1992. Immunohemopoietic effects of dietary nucleotide restriction in mice. *Transplantation* 53(2): 467-472.
- Kulkarni, A.D., F.B. Rudolph, and C.T. Van Buren. 1994. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. *J. Nutr.* 124: 1442-1446.
- Kuniyasu, H. K. Yoshida, T. Sasaki, T. Sasahira, K. Fujii, and H. Ohmori. 2006. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. *Int. J. Cancer.* 118: 571-576.
- Lands, W.E. 2005. Long-term fat intake and biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 721S-725S.
- Larsen, S.T., B.R. Wiegand, F.C. Parrish, Jr., J.E. Swan, and J.C. Sparks. 2009. Dietary conjugated linoleic acid changes belly and bacon quality from pigs fed varied lipid sources. *J. Anim. Sci.* 87: 285-295.
- Lauridsen, C., H. Mu, and P. Henckel. 2005. Influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and age at slaughtering on performance, slaughter- and meat quality, lipoproteins, and tissue deposition of CLA in barrows. *Meat Sci.* 69: 393-399.
- Lawless, F., C. Stanton, P. L'Escop, R. Devery, P. Dillon, and J.J. Murphy. 1999. Influence of breed on bovine milk *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid content. *Livest. Prod. Sci.* 62(1): 43-49.
- Lee, K.N., D. Kritchevsky, and M.W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108: 19-25.
- Lee, K.N., M.W. Pariza, and J.M. Ntambi. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248(3): 817-821.
- Lee, J.H., K.H. Cho, K.T. Lee, and M.R. Kim. 2005. Antiatherogenic effects of structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice. *J. Agric. Food Chem.* 53(18): 7295-7301.
- Lee, D.N., S.R. Liu, Y.T. Chen, R.C. Wang, S.Y. Lin, and C.F. Weng. 2007. Effects of diets supplemented with organic acids and nucleotides on growth, immune response and digestive development in weaned pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91: 508-518.

- Leung, Y.H., and R.H. Liu. 2000. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than *cis*-9,*trans*-11-conjugated linoleic acid isomer. *J. Agric. Food Chem.* 48(11): 5469-5475.
- Levis, D.G., and J.J. Ford. 1989. The influence of androgenic and estrogenic hormones on sexual behavior in castrated adult male pigs. *Horm. Behav.* 23: 393-411.
- Li, Y., and B.A. Watkins. 1998. Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids* 33(4): 417-425.
- Liew, C., H.A.J. Schut, S.F. Chin, M.W. Pariza, and R.H. Dashwood. 1995. Protection of conjugated linoleic acid against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinine-induced colon carcinogenesis in the F344 rats: a study of inhibitory mechanism. *Carcinogenesis* 16: 3037-3043.
- Lin, Y., A. Kreeft, J.A.E. Schuurbijs, and R. Draijer. 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 12: 183-189.
- Lin, T.Y., C.W. Lin, and Y.J. Wang. 2003. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. *Food Chem.* 83(1): 27 – 31.
- Liu, K.L., and M.A. Belury. 1998. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Lett.* 127(1-2): 15-22.
- Liu, J.R., B.Q. Chen, Y.M. Yang, X.H. Han, Y.B. Xue, X.L. Wang, Y.M. Zheng, and R.H. Liu. 2002. Effects of *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid on cancer cycle. *Environ. Health Prev. Med.* 7: 205-210.
- Liu, L.F., A. Purushotham, A.A. Wendel, and M.A. Belury. 2007. Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292: G1671-G1682.
- Livisay, S.A., S. Zhou, C. Ip, and E.A. Decker. 2000. Impact of dietary conjugated linoleic acid on the oxidative stability of rat liver chromosomes and skeletal muscle homogenates. *J. Agric. Food Chem.* 48(9): 4162-4167.
- Loor, J.J., X. Lin and J.H. Herbein. 2002. Dietary transvaccenic acid (*trans*-11-18:1) increases concentration of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (rumenic acid) in tissues of lactating mice and suckling pups. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 85-99.
- López-Navarro, A.T., M.A. Ortega, J. Peragón, J.D. Bueno, A. Gil, and A. Sánchez-Pozo. 1996a. Deprivation of dietary nucleotides decreases protein synthesis in the liver and small intestine in rats. *Gastroenterology* 110: 1760-1769.
- López-Navarro, A.T., A.D. Bueno, A. Gil, and A. Sánchez-Pozo. 1996b. Morphological changes in hepatocytes of rats deprived of dietary nucleotides. *Br. J. Nutr.* 76: 579-589.

- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.M. Ermer, P.S. Miller, R.J. Kittok, and W.W. Stroup. 1994b. The effect of energy and protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2051-2060.
- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.S. Miller, R.J. Kittok, and W.W. Stroup. 1994a. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2038-2050.
- Luna, P., J. Fontecha, M. Juárez, and M.A. de la Fuente. 2005. Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids* 40(5): 445-454.
- Luna, P., M.A. de la Fuente, D. Salvador, and G. Márquez-Ruiz. 2007. Differences in oxidation kinetics between conjugated and non-conjugated methyl linoleate. *Lipids* 42(12): 1085-1092.
- Lund, P., K. Sejrsen, and E.M. Straarup. 2006. Incorporation of conjugated linoleic acid and vaccenic acid into lipids from rat tissues and plasma. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 991-998.
- Luongo, D., P. Bergamo, and M. Rossi. 2003. Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jurkat T cells. *Immunol. Lett.* 90: 195-201.
- Ma, D.W.L., A.A. Wierzbicki, C.J. Field, and M.T. Clandinin. 1999. Preparation of conjugated linoleic acid from safflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 729-730.
- Majumder, B., K.W.J. Wahle, S. Moir, A. Schofield, S.N. Choe, A. Farquharson, I. Grant, and S.D. Heys. 2002. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J.* 16: 1447-1449.
- Maldjian, A., P. Penny, and R. Noble. 2003. Docosahexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. *In: Vriese, S. R. D., and A. B. Christophe (eds.). Male Fertility and Lipid Metabolism.* AOCS Press, Champaign, Illinois, USA. pp. 60-72.
- Maldonado, J., J. Navarro, E. Narbona, and A. Gil. 2001. The influence of dietary nucleotides on humoral and cell immunity in the neonate and lactating infant. *Early Hum. Dev.* 65(suppl. 2): S69-S74.
- Manzano, M., A.C. Abadía-Molina, E.G. Olivares, A. Gil, and R. Rueda. 2003. Dietary nucleotides accelerate changes in intestinal lymphocyte maturation in weanling mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 37: 453-461.
- Marijnen, Y.M.T., D. deKorte, W.A. Haverkort, E.J.S. den Breejen, A.H. van Gennip, and D. Roos. 1989. Studies on the incorporation of precursors into purine and pyrimidine nucleotides via 'de novo' and 'salvage' pathways in normal lymphocytes and lymphoblastic cell-line cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1012: 148-155.
- Marin-Guzman, J., D.C. Mahan, Y.K. Chung, J.L. Pate, and W.F. Pope. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75: 2994-3003.

- Martin, J.C., S. Gregoire, M.H. Siess, M. Gently, J.M. Chardigny, O. Berdeaux, P. Juaneda, and J.L. Sébédio. 2000. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* 35(1): 91-98.
- Martin, D., E. Muriel, T. Antequera, T. Perez-Palacios, and J. Ruiz. 2008a. Fatty acid composition and oxidative susceptibility of fresh loin and liver from pigs fed conjugated linoleic acid in combination with monounsaturated fatty acids. *Food Chem.* 108: 86-96.
- Martin, D., E. Muriel, E. Gonzalez, J. Viguera, and J. Ruiz. 2008b. Effects of dietary conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids on productive, carcass and meat quality traits of pigs. *Livest. Sci.* 117: 155-164.
- Martin, D., T. Antequera, E. Muriel, A.I. Andres, and J. Ruiz. 2008c. Oxidative changes of fresh loin from pig, caused by dietary conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids during refrigerated storage. *Food Chem.* 111: 730-737.
- Martínez-Augustin, O., J.J. Boza, J.I. del Pino, J. Lucerna, A. Martínez-Valverde, and A. Gil. 1997a. Dietary nucleotides might influence the humoral immune response against cow's milk proteins in preterm neonates. *Biol. Neonate* 7(4): 215-223.
- Martínez-Augustin, O., J.J. Boza, J. Navarro, A. Martínez-Valverde, M. Araya, and A. Gil. 1997b. Dietary nucleotides may influence the humoral immunity in immunocompromised children. *Nutrition* 13(5): 465-469.
- Martínez-Puig, D., E.G. Manzanilla, J. Morales, E. Borda, J.F. Pérez, C. Piñeiro, and C. Chetrit. 2007. Dietary nucleotide supplementation reduces occurrence of diarrhoea in early weaned pigs. *Livest. Sci.* 108: 276-279.
- Masoumi, R., A. Towhidi, A. Nejati Javaremi, H. Nabizadeh, and Zhandi. 2008. Cloprostenol injection improves reproductive characteristics in low libido Iranian Holstein bulls. *Pak. J. Biol. Sci.* 11(7): 1027-1031.
- Mateo, C.D., D.N. Peters, and H.H. Stein. 2004. Nucleotides in sow colostrum and milk at different stages of lactation. *J. Anim. Sci.* 82: 1339-1342.
- McNeill, G.P., C. Rawlins, and A.C. Peilow. 1999. Enzymatic enrichment of conjugated linoleic acid isomers and incorporation into triglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 1265-1268.
- McNeel, R.L., and H.J. Mersmann. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J. Nutr. Biochem.* 14: 266-274.
- Metz, S.A. 1988. Arachidonic acid and its metabolites: evolving roles as transmembrane signals for insulin release. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 32: 187-202.
- Michael, A.E., D.R.E. Abayasekara, and G.E. Webley. 1993. The luteotrophic actions of prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> on dispersed marmoset luteal cells are differentially mediated via cyclic AMP and protein kinase C. *J. Endocrinol.* 138: 291-298.
- Michael, A.E., D.R.E. Abayasekara, and G.E. Webley. 1994. Cellular mechanisms of luteolysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 99: R1-R9.



- Miller, C.C., Y. Park, M.W. Pariza, and M.E. Cook. 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animal partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 1107-1112.
- Miller, A., C. Stanton, and R. Devery. 2001. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids* 36(10): 1161-1168.
- Miner, J.L., C.A. Cederberg, M.K. Nielsen, X. Chen, and C.A. Baile. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. *Obes. Res.* 9(2): 129-134.
- Mir, P.S., E.K. Okine, L. Goonewardene, M.L. He, and Z. Mir. 2003. Effects of synthetic conjugated linoleic acid (CLA) or bio-formed CLA as high CLA beef on rat growth and adipose tissue development. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 583-592.
- Mirand, P.P., M.A. Arnal-Bagnard, L. Mosoni, Y. Faulconnier, J.M. Chardigny, and Y. Chilliard. 2004. *Cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid isomers do not modify body composition in adult sedentary or exercised rats. *J. Nutr.* 134: 2263-2269.
- Mitre, R., C. Cheminade, P. Allaume, P. Legrand, A.B. Legrand. 2004. Oral intake of shark oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. *Theriogenology* 62: 1557-1566.
- Moloney, F., T.P. Yeow, A. Mullen, J.J. Nolan, and H.M. Roche. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 887-895.
- Moloney, F., S. Toomey, E. Noone, A. Nugent, B. Allan, C.E. Loscher, and H.M. Roche. 2007. Antidiabetic effects of *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes* 56: 574-582.
- Mougios, V., A. Matsakas, A. Petridou, S. Ring, A. Sagredos, A. Melissopoulou, N. Tsigilis, and M. Nikolaidis. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem.* 12: 585-594.
- Mounts, T.L., H.J. Dutton, and D. Glover. 1970. Conjugation of polyunsaturated acids. *Lipids* 5(12): 997-1005.
- Moya-Camarena, S.Y., J.P. Vanden Heuvel, S.G. Blanchard, L.A. Leesnitzer, and M.A. Belury. 1999. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR $\alpha$ . *J. Lipid Res.* 40: 1426-1433.
- Munday, J.S., K.G. Thompson, and K.A. James. 1999. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty acid streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br. J. Nutr.* 81: 251-255.
- Nagao, T., Y. Yamauchi-Sato, A. Sugihara, T. Iwata, K. Nagao, T. Yanagita, S. Adachi, and Y. Shimada. 2003a. Purification of conjugated linoleic acid isomers through a process including lipase-catalyzed selective esterification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(6): 1429-1433.

- Nagao, K., N. Inoue, Y.M. Wang, and T. Yanagita. 2003b. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (*fafa*) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 562-566.
- Narasimha Rao, A.V.N., G.B. Haranath, C. Visweswara Rao, and J. Ramamohana Rao. 1986. Effect of prostaglandin F2 alpha on libido, seminal quantity and quality of buffalo bulls. *Theriogenology* 25(5): 689-692.
- Navarro, V., J. Miranda, I. Churrua, A. Fernandez-Quintela, V.M. Rodríguez, and M.P. Portillo. 2006. Effects of *trans*10, *cis*12 conjugated linoleic acid on body fat and serum lipid in young and adult hamsters. *J. Physiol. Biochem.* 62: 81-87.
- Navarro, J., J. Maldonado, E. Narbona, A. Ruiz-Bravo, J.L. García, J.A. Molina, and A. Gil. 2008. Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants. *BioFactors* 10(1): 67-76.
- Nelson, D. L., M.M. Cox, y C.M. Cuchillo. 2001a. Lípidos. *In: Lehninger: Principios de Bioquímica*. 3ra. ed., Omega S.A., Barcelona, España. pp. 240-267.
- Nelson, D.L., M.M. Cox, y C.M. Cuchillo. 2001b. Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas. *In: Lehninger: Principios de Bioquímica*. 3ra. ed., Omega S.A., Barcelona, España. pp. 688-735.
- Nestel, P., A. Fujii, and T. Allen. 2006. The *cis*-9, *trans*-11 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) lowers plasma triglyceride and raises HDL cholesterol concentrations but does not suppress aortic atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 189: 282-287.
- Nicolosi, R., E.J. Rogers, D. Kritchevsky, J.A. Scimeca, and P.J. Huth. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and artery aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22(5): 266-277.
- Niswender, G.D., and T.M. Nett. 1988. The corpus luteum and its control. *In: Knobil, E., and J. Neill (eds.). The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd. New York, USA. pp. 499-525.
- Noone, E.J., H.M. Roche, A.P. Nugent, and M.J. Gibney. 2002. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 88: 243-251.
- Noto, A., P. Zahradka, N.R. Ryz, N.Yurkova, X. Xie, and C.G. Taylor. 2007. Dietary conjugated linoleic acid preserves pancreatic function and reduces inflammatory markers in obese, insulin-resistant rats. *Metab. Clin. Exp.* 56: 142-151.
- Novak, D.A., J.D. Carver, and L.A. Barness. 1994. Dietary nucleotides affect hepatic growth and composition in the weanling mouse. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 18: 62-66.
- Nuernberg, K., G. Nuernberg, K. Ender, D. Dannenberger, W. Schabbel, S. Grumbach, W. Zupp, and H. Steinhart. 2005. Effect of grass vs. concentrate feeding on the fatty acid profile of different fat depots in lambs. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 737-745.

- Nugent, A.P., H.M. Roche, E.J. Noone, E. Long, D.K. Kelleher, and M.J. Gibney. 2005. The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune functions in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59: 742-750.
- Nuñez, M.C., M.V. Ayudarte, D. Morales, M.D. Suárez, and A. Gil. 1990. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 4: 598-604.
- Nuñez, M.C., M.V. Ayudarte, A. Gil, and M.D. Suárez. 1993. Effects of dietary nucleotides on the fatty acid composition of rat liver microsomes. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 101: 123-128.
- O'Quinn, P.R., J.L. Nelssen, R.D. Goodband, J.A. Unruh, J.C. Woodworth, J.S. Smith, and M.D. Tokach. 2000. Effects of modified tall oil versus a commercial source of conjugated linoleic acid and increasing levels of modified tall oil on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 78: 2359-2368.
- O'sea, M., C. Stanton, and R. Devery. 1999. Antioxidant enzyme defence response of human MCF-7 and SW-480 cancer cells to conjugated linoleic acid. *Anticancer Res.* 19: 1953-1960.
- O'shea, M., J. Bassaganya-Riera, and I.C.M. Mohede. 2004. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(suppl.): 1199S-1296S.
- Ogawa, J., S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara, and S. Shimizu. 2005. Production of conjugated linoleic acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 100(4): 355-364.
- Ogoshi, S., M. Iwasa, T. Yonezawa, and T. Tamiya. 1985. Effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 9: 339-342.
- Oh, D.K., G.H. Hong, Y. Lee, S. Min, H.S. Sin, and S.K. Cho. 2003. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 907-912.
- O'Hagan, S., and A. Menzel. 2003. A subchronic 90-day oral rat toxicity study and in vitro genotoxicity studies with a conjugated linoleic acid product. *Food Chem. Toxicol.* 41: 1749-1760.
- Ohnuki, K., S. Haramizu, K. Oki, K. Ishihara, and T. Fushiki. 2001a. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids* 36(6): 583-587.
- Ohnuki, K., S. Haramizu, K. Oki, K. Ishihara, and T. Fushiki. 2001b. Increase energy metabolism and suppressed body fat accumulation in mice by low concentration of conjugated linoleic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(10): 2200-2204.
- Olofsson, J., and P.C.K. Leung. 1994. Autocrine/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 100: 87-91.

- Ostrowska, E., M. Muralitharan, R.F. Cross, D.E. Bauman, and F.R. Dunshea. 1999. Dietary conjugated linoleic acid increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J. Nutr.* 129: 2037-2042.
- Ostrowska, E., R.F. Cross, M. Muralitharan, D.E. Bauman, and F.R. Dunshea. 2003. Dietary conjugated linoleic acid differentially alters fatty acid composition and increases conjugated linoleic acid content in porcine adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 90: 915-928.
- Ostrowska, E., A. Knowles, M. Muralitharan, R.F. Cross, D.E. Bauman, and F.R. Dunshea. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid on hematological and humoral response in the grower pig. *Aust. J. Agric. Res.* 55: 711-718.
- Palacios, A., V. Piergiacomini, and A. Catalá. 2003. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid and vitamin A during non enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes and mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 250: 107-113.
- Palmquist, D.L., and J.E. Santora. 1999. Endogenous synthesis of rumenic acid in rodents and humans. *In: Yurawecz, M.P., M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza and G.J. Nelson (eds.). Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. Vol. I. AOCS Press. Champaign, IL. pp. 201-208.*
- Pariza, M.W., S.H. Ashoor, F.S. Chu, and D.B. Lund. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.* 7(2-3): 63-69.
- Pariza, M.W. 1997. Conjugated linoleic acid, a newly recognized nutrient. *Chem. Ind.* 12: 464-466.
- Pariza, M.W., Y. Park, and M.E. Cook. 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 8-13.
- Pariza, M.W., Y. Park, and M.E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40: 283-298.
- Pariza, M.W., Y. Park, X. Xu, J. Ntambi, and K. Kang. 2003. Speculation on the mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *In: Sebédio, J., W.W. Christie, and R. Adlof (eds.). Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. 2: Champaign, IL, USA: AOCS Press. pp. 251-258.*
- Park, Y., K.J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M.E. Cook, and M.W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32: 853-858.
- Park, Y., J.M. Storkson, K.J. Albright, W. Liu, and M.W. Pariza. 1999a. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34(3): 235-241.
- Park, Y., K.J. Albright, J.M. Storkson, W. Liu, M.E. Cook, and M.W. Pariza. 1999b. Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 34(3): 243-248.
- Park, H.S., J.H. Ryu, Y.L. Ha, and J.H.Y. Park. 2001. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br. J. Nutr.* 86: 549-555.

- Park, Y., and M.W. Pariza. 2007. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* 40: 311-323.
- Park, Y., K.J. Albright, J.M. Storkson, W. Liu, and M.W. Pariza. 2007. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents body fat accumulation and weight gain in an animal model. *J. Food Sci.* 72(8): S612-S617.
- Park, Y. 2009. Conjugated linoleic acid (CLA): good o bad *trans* fat? *J. Food Compo. Anal.* 22(Suppl. 1): S4-S12.
- Parodi, P.W. 1977. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* 60: 1550-1553.
- Parodi, P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 82: 1339-1349.
- Paulenz, H., O. Taugbø, P.O. Hofmo, and K. Saarem. 1995. A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver on polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. *Vet. Res. Commun.* 19: 264-269.
- Pégorier, J.P., A. Le May, and J. Girad. 2004. Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.* 134: 2444S-2449S.
- Pérez, M.J., F. Sánchez-Medina, M. Torres, A. Gil, and A. Suárez. 2004. Dietary nucleotides enhance the liver redox state and protein synthesis in cirrhotic rats. *J. Nutr.* 134: 2504-2508.
- Pérez-Matute, P., A. Marti, J.A. Martínez, M.P. Fernández-Otero, K.L. Stanhope, P.J. Havel, and M.J. Moreno-Aliaga. 2007. Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 268: 50-58.
- Perignon, J.L., D.M. Bories, A.M. Houllier, L. Thuillier, and P.H. Cartier. 1987. Metabolism of pyrimidine bases and nucleosides by pyrimidinenucleoside phosphorylases in cultured human lymphoid cells. *Biochim. Biophys. Acta* 928: 130-136.
- Petridou, A., V. Mougios, and A. Sagredos. 2003. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids* 38(8): 805-811.
- Pickering, L.K., D.M. Granoff, J.R. Erickson, M.L. Masor, C.T. Cordle, J.P. Schaller, T.R. Winship, C.L. Paule, and M.D. Hilty. 1998. Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics* 101(2): 242-249.
- Plescia, O.J., A.H. Smith, and K. Grinwich. 1975. Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72(5): 1848-1851.
- Poirier, H., I. Noi, L. Clément, M. Guerrero-Millo, and P. Besnard. 2005a. Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipoatrophic syndrome in the mouse. *Biochimie.* 87: 73-79.
- Poirier, H., C. Rouault, L. Clément, I. Niot, M.C. Monnot, M. Guerre-Millo, and P. Besnard. 2005b. Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse. *Diabetologia* 48: 1059-1065.

- Poirier, H., J.S. Shapiro, R.J. Kim, and M.A. Lazar. 2006. Nutritional supplementation with *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes* 55: 1634-1641.
- Poulos, A., A. Darin-Bennet, and I.G. White. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol.* 46B: 541-549.
- Poulos, A., P. Sharp, D. Johnson, I. White, and A. Fellenberg. 1986. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem. J.* 240: 891-895.
- Poulos, S.P., M. Sisk, D.B. Hausman, M.J. Azain, and G.J. Hausman. 2001. Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.* 131: 2722-2731.
- Poyser, N.L. 1995. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 53: 147-195.
- Quan, R., L.A. Barness, and R. Uauy. 1990. Do infants need nucleotide supplemented formula for optimal nutrition? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 11: 429-437.
- Quignard-Boulangé, A., P. Clouet, and B. Schmitt. 2007. Effects of dietary conjugated linoleic acid in the control of adiposity and obesity-related disorders. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 109: 935-944.
- Rahman, S.M., Y.M. Wang, H. Yotsumoto, J.Y. Cha, S.Y. Han, S. Inoue, and T. Yanagita. 2001a. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 17(5): 385-390.
- Rahman, S.M., Y.M. Wang, S.Y. Han, J.Y. Cha, N. Fukuda, H. Yotsumoto, and T. Yanagita. 2001b. Effects of short-term administration of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in white and brown adipose tissue of starved/refed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food Res. Int.* 34: 515-520.
- Ramírez-Santana, C., F.J. Pérez-Cano, C. Castellote, M. Castell, M. Rivero, M. Rodríguez-Palmero, and À. Franch. 2009. Higher immunoglobulin production in conjugated linoleic acid-supplemented rats during gestation and suckling. *Br. J. Nutr.* 102(6): 858-868.
- Ramsay, T.G., C.M. Evock-Clover, N.C. Steele, and M.J. Azain. 2001. Dietary conjugated linoleic acid alters fatty acid composition of pig skeletal muscle and fat. *J. Anim. Sci.* 79: 2152-2161.
- Rao, C.V., B. Simi, T.T. Wynn, K. Garr, and B.S. Reddy. 1996. Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor production in male F344 rats. *Cancer Res.* 56: 532-537.
- Ren, D., Y. Xing, M. Lin, Y. Wu, K. Li, W. Li, S. Yang, T. Guo, J. Ren, J. Ma, L. Lan, and L. Huang. 2009. Evaluation of boar gonad development, spermatogenesis with regard to semen characteristics, libido and serum testosterone levels based on Large White Duroc × Chinese Erhualian crossbred boars. *Reprod. Dom. Anim.* 44(6): 913-919.

- Reusch, J. 2002. Current concepts in insulin resistance type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* 90(5; Suppl. 1): 19G-26G.
- Richardson, M.C. 1986. Hormonal control of ovarian luteal cells. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 8: 321-378.
- Rickert, R., H. Steinhart, J. Fritsche, N. Sehat, M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.A.G. Roach, K. Eulitz, Y. Ku, and J.K.G. Kramer. 1999. Enhanced resolution of conjugated linoleic acid isomers by Tandem column silver-ion high performance liquid chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 22(3): 144-148.
- Risérus, U., L. Berglund, and B. Vessby. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *Int. J. Obes.* 25: 1129-1135.
- Risérus, U., S. Basu, S. Jovinge, G.N. Fredrikson, J. Ärnlöv, and B. Vessby. 2002a. Supplementation with conjugated linoleic acids causes isomer-dependent oxidative stress and elevated c-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation* 106: 1925-1929.
- Risérus, U., P. Arner, K. Brismar, and B. Vessby. 2002b. Treatment with dietary *trans*10 *cis*12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25(9): 1516-1521.
- Risérus, U., A. Smedman, S. Basu, and B. Vessby. 2003. CLA and body weight regulation in humans. *Lipids* 38(2): 133-137.
- Risérus, U. 2006. Trans fatty acids and insulin resistance. *Atheroscler. Suppl.* 7: 37-39.
- Robinson, J.A.B., and M.M. Buhr. 2005. Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology* 63(2): 668-678.
- Roca, J., J.M. Vázquez, M.A. Gil, C. Cuello, I. Parrilla, and E.A. Martínez. 2006. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 41(Suppl. 2): 43-53.
- Rocha-Uribe, A., y E. Hernández, 2004. Síntesis de ácido linoleico conjugado por isomerización alcalina usando propilenglicol como solvente. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2(3): 193-200.
- Roche, H.M., E. Noone, C. Sewter, S. McBennet, D. Savage, M.J. Gibney, S. O'Rahilly, and A.J. Vidal-Puig. 2002. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXR $\alpha$ . *Diabetes* 51: 2037-2044.
- Rodwell, V.W. 2004. Metabolismo de nucleótidos de purinas y pirimidinas. In: Murray, R.K., D.G. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell (eds.). Harper. *Bioquímica Ilustrada*. 16<sup>a</sup> ed. Manual Moderno México, D.F. pp. 333-342.
- Rooke, J.A., C.C. Shao, and B.K. Speake. 2001. Effects of feeding tunc oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 121: 315-322.

- Rossi, R., G. Pastorelli, V. Bonpempo, and C. Corino. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid on immunoglobulin concentration in sow colostrums and piglet serum. *Vet. Res. Commun.* 28: 241-244.
- Rothchild, I. 1981. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Rec. Prog. Horms. Res.* 37: 183-298.
- Rudolph, F.B. 1994. The biochemistry and physiology of nucleotides. *J. Nutr.* 124: 124S-127S.
- Ryder, J.W., C.P. Portocarrero, X.M. Song, L. Cui, M. Yu, T. Combatsiaris, D. Galuska, D.E. Bauman, D.M. Barbano, M.J. Charron, J.R. Zierath, and K.L. Houseknecht. 2001. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid: improve glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50: 1149-1157.
- Salati, L.M., C.J. Gross, L.M. Henderson, and D.A. Saviano. 1984. Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-mono-phosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. *J. Nutr.* 114: 753-760.
- Samuelsson, B., E. Granstrom, K. Green, M. Hamberg, and S. Hammarstrom. 1975. Prostaglandins. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 669-695.
- Sánchez-Pozo, A., J. Morillas, L. Moltó, R. Robles, and A. Gil. 1994. Dietary nucleotides influence lipoprotein metabolism in newborn infants. *Pediatr. Res.* 35(1): 112-116.
- Sanders, T.A.B. 1988. Essential and *trans*-fatty acids in nutrition. *Nutr. Res. Rev.* 1: 57-78.
- Sanderson, A.R., and Y. He. 1994. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* 124: 131S-137S.
- Santora, J.E., D.L. Palmquist, and K.L. Roehrig. 2000. *Trans*-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *J. Nutr.* 130: 208-215.
- Saruta, T., and N.M. Kaplan. 1972. Adrenocortical steroidogenesis: the effects of prostaglandins. *J. Clin. Invest.* 51: 2246-2251.
- Schlimme, E., D. Martin, and H. Meisel. 2000. Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84(Suppl. 1): S59-S68.
- Schmid, A., M. Collomb, R. Sieber, and G. Bee. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci.* 73: 29-41.
- Schønberg, S., and H.E. Krokan. 1995. The inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res.* 15: 1241-1246.
- Scimeca, J.A. 1999. Cancer inhibition in animals. *In*: Yurawecz, M.P., M.M. Mossobo, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, and G.J. Nelson (eds.). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. AOCS Press, Champaign, IL. USA. pp. 420-443.
- Sébédio, J.L., P. Juanéda, G. Dobson, I. Ramilison, J.C. Martin, J.M. Chardigny, and W.W. Christie. 1997. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1345: 5-10.



- Sehat, N., M.P. Yurawecz, J.A.G. Roach, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, and Y. Ku. 1998a. Silver-ion high-performance liquid chromatography separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 33: 217-222.
- Sehat, N., J.K.G. Kramer, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz, J.A.G. Roach, K. Eulitz, K.M. Morehouse, and Y. Ku. 1998b. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 33: 963-971.
- Sehat, N., R. Ricker, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.P. Yurawecz, J.A.G. Roach, R.O. Adlof, K.M. Morehouse, J. Fritsche, K.D. Eulitz, H. Steinhart, and Y. Ku. 1999. Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-high performance liquid chromatography. *Lipids* 34: 407-413.
- Shantha, N.C., L.N. Ram, J. O'Leary, C.L. Hicks, and E.A. Decker. 1995. Conjugated linoleic acid concentration in dairy products as affected by processing and storage. *J. Food Sci.* 60(4): 695-697.
- Shultz, T.D., B.P. Chew, W.R. Seaman, and L.O. Leudecke. 1992. Inhibitory effect of conjugated linoleic acid and beta-carotene on the *in vitro* growth of human cancer cells. *Cancer Lett.* 63: 125-133.
- Sihanidou, T., H. Mandyla, I. Papassotiriou, and D. Anagnostakis. 2004. Serum lipids in preterm infants fed a formula supplemented with nucleotides. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38: 56-60.
- Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla. 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandins synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56: 387-437.
- Simon, O., K. Männer, K. Schäfer, A. Sagredos, and K. Eder. 2000. Effects of conjugated linoleic acid on protein to fat proportions, fatty acids, and plasma lipids in broilers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 402-410.
- Simopoulos, A.P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56: 365-379.
- Sisk, M.B., D.B. Hausman, R.J. Martin, and M.J. Azain. 2001. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *J. Nutr.* 131: 1668-1674.
- Smedman, A., and B. Vessby. 2001. Conjugated linoleic acid supplementation in humans metabolic effects. *Lipids* 36(8): 773-781.
- Smith, W.L. 1989. The eicosanoides and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* 259: 315-324.
- Smith, S.B., T.S. Hively, G.M. Cortese, J.J. Han, K.Y. Chung, P. Castañeda, C.D. Gilbert, V.L. Adams, and H.J. Mersmann. 2002. Conjugated linoleic acid depresses the  $\Delta^9$  desaturase index and stearoyl coenzyme A desaturase enzyme activity in porcine subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 80: 2110-2115.

- Song, H.J., I. Grant, D. Rotondo, I. Mohede, N. Sattar, S.D. Heys, and K.W.J. Wahle. 2005. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59: 508-517.
- Sonoda, T., and M. Tatibana. 1978. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim, Biophys. Acta* 521: 55-66.
- Sparks, J.C., B.R. Wiegand, F.C. Parrish, and D.R. Zimmerman. 1999. Effects of length of feeding conjugated linoleic acid (CLA) on growth and body composition of pigs. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 1): 178 (Abstr.).
- Srikandakumar, A., and B.R. Downey. 1989. Induction of ovulation in gilts with cloprostenol. *Theriogenology* 32: 445-449.
- Stachowska, E., M. Baškiewicz-Masiuk, V. Dziedziejko, G. Adler, J. Bober, B. Machaliński, and D. Chlubek. 2007. Conjugated linoleic acid can change phagocytosis of human monocytes/macrophages by reduction in Cox-2 expression. *Lipids* 42: 707-716.
- Stangl, G.I. 2000. Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. *J. Nutr.* 130: 1140-1146.
- Stanton, C., F. Lawless, G. Kjellmer, D. Harrington, R. Devery, J.F. Connolly, and J. Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62(5): 1083-1086.
- Storkson, J.M., Y. Park, M.E. Cook, and M.W. Pariza. 2005. Effects of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) and cognates on apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *Nutr. Res.* 25: 387-399.
- Strzeżek, J., L. Fraser, m. Kuklińska, A. Dziekońska, and M. Lecewicz. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod. Biol.* 4(3): 271-287.
- Stubbs, C.D., and A.D. Smith. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta–Rev. Biomembranes* 779: 89-137.
- Su, N.D., X.W. Liu, M.R. Kim, T.S. Jeong, and D.E. Sok. 2003. Protective action of CLA against oxidative inactivation of paraoxonase 1, an antioxidant enzyme. *Lipids* 38(6): 615-622.
- Sugano, M., A. Tsujita, M. Yamasaki, K. Yamada, I. Ikeda, and D. Kritchevsky. 1997. Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 8(1): 38-43.
- Sugano, M., A. Tsujita, M. Yamasali, M. Noguchi, and K. Yamada. 1998. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 33: 521-527.

- Sukumar, P., A. Loo, E. Magur, J. Nandi, A. Oler, and R.A. Levine. 1997. Dietary supplementation of nucleotides and arginine promotes healing of small bowel ulcers in experimental ulcerative ileitis. *Dig. Dis. Sci.* 42: 1530-1536.
- Sun, D., X. Zhu, S. Qiao, S. Fan, and D. Li. 2004. Effects of conjugated linoleic acid levels and feeding intervals on performance, carcass traits and fatty acid composition of finishing barrows. *Arch. Anim. Nutr.* 58(4): 277-286.
- Szurop, I., A. Nagy, and W. Jöchle. 1985. Stimulation of libido in pubertal and mature boars with prostaglandin F<sub>2α</sub> analogs: clinical observations. *Reprod. Dom. Anim.* 20(2): 8 (Abstr.).
- Szymczyk, B., P.M. Pisulewski, W. Szczurek, and P. Hanczakowski. 2001. Effects of conjugated linoleic acid on growth performance, feed conversion efficiency, and subsequent carcass quality in broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 85: 465-473.
- Takahashi, Y., M. Kushiro, K. Shinohara, and T. Ide. 2002a. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 133(3): 395-404.
- Takahashi, K., K. Kawamata, Y. Akiba, T. Iwata, and M. Kasai. 2002b. Influence of dietary conjugated linoleic acid isomers on early inflammatory responses in male broiler chickens. *Br. Poultry Sci.* 43: 47-53.
- Takahashi, K., Y. Akiba, T. Iwata, and M. Kasai. 2003. Effect of a mixture of conjugated linoleic acid isomers on growth performance and antibody production in broiler chicks. *Br. J. Nutr.* 89: 691-694.
- Tarek, J.J., Y. Li, I.A. Schoenlein, K. Alle, and B.A. Watkins. 1998. Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acid is influenced by dietary n-6:n-3 fatty acid ratio. *J. Nutr. Biochem.* 9: 258-266.
- Taylor, J.S.W., S.R.P. Williams, R. Rhys, P. James, and M.P. Frenneaux. 2006. Conjugated linoleic acid impairs endothelial function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 307-312.
- Thibier, M., and B. Guerin. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62(1): 233-251.
- Thiel-Cooper, R.L., F.C. Parrish, Jr., J.C. Sparks, B.R. Wiegand, and R.C. Ewan. 2001. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 79: 1821-1828.
- Thijssen, M.A.M.A., C. Malpuech-Brugère, S. Gregoire, J.M. Chardigny, J.L. Sébédio, and R.P. Mensink. 2005. Effects of specific CLA isomers on plasma fatty acid profile and expression of desaturases in humans. *Lipids* 40(2): 137-145.
- Thompson, H., Z. Zhu, S. Banni, K. Darcy, T. Loftus, and C. Ip. 1997. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implications for reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.* 57: 5067-5072.

- Tischendorf, F., F. Schöne, U. Kirchheim, and G. Jahreis. 2002a. Influence of a conjugated linoleic acid mixture on growth, organ weights, carcass traits and meat quality in growing pigs. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 86: 117-128.
- Tischendorf, F., P. Möckel, F. Schöne, M. Plonné, and G. Jahreis. 2002b. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the distribution of fatty acids in serum lipoprotein fractions and different tissues of growing pigs. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 86: 313-325.
- Tontonoz, P., L. Nagy, J.G.A. Alvarez, V.A. Thomazy, and R.M. Evans. 1998. PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252.
- Toomey, S., B. Harhen, H.M. Roche, D. Fitzgerald, and O. Belton. 2006. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis* 187: 40-49.
- Torres, M.I., M.I. Fernández, A. Gil, and A. Rios. 1997. Effect of dietary nucleotides on degree of fibrosis and steatosis induced by oral intake of thioacetamine. *Dig. Dis. Sci.* 42(6): 1322-1328.
- Torres-López, M.I., I. Fernández, L. Fontana, A. Gil, and A. Rios. 1996. Influence of dietary nucleotides on liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in cirrhosis induced by thioacetamide. *Gut* 38: 260-264.
- Trepstra, A.H.M., A.C. Beynen, H. Everts, S. Kocsis, M.B. Katan, and P.L. Zock. 2002. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in excreta. *J. Nutr.* 132: 940-945.
- Tricon, S., G. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. Russell, E.L. Jones, R.F. Grimble, C.M. Williams, P. Yaqoob, and P. Calder. 2004a. Opposing effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 614-620.
- Tricon, S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J.J. Russell, R.F. Grimble, C.M. Williams, P.C. Calder, and P. Yaqoob. 2004b. Effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 1626-1533.
- Tsou-Yau, K.I., C.B. Huang, W. Chen, S.J. Chen, Y.H. Chou, F.Y. Huang, K. Em-Kua, N. Chen, M. McCue, P.A. Alarcon, R.L. Tressler, G.M. Comer, G. Baggs, R.J. Merritt, and M.L. Masor. 2003. Effects of nucleotides on diarrhea and immune response in healthy term infants in Taiwan. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 36: 37-43.
- Tsuboi, K., Y. Sugimoto, A. Iwane, K. Tamamoto, S. Yamamoto, and A. Ichikawa. 2000. Uterine expression of prostaglandin H2 synthase in late pregnancy and during parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Endocrinology* 141: 315-324.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H.J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto, and O. Ezaki. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49: 1534-2542.

- Uauy, R., G. Stringel, R. Thomas, and R. Quan. 1990. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 10: 497-503.
- Uauy, R., R. Quan, and A. Gil. 1994. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J. Nutr.* 124: 1436S-1441S.
- Uehara, H., T. Suganuma, S. Negishi, S. Ueno, and K. Sato. 2006. A novel method for solvent fractionation of two CLA isomers. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81(3): 261-267.
- Vaille, K., J. Férézou, G. Amsler, A. Quignard-Boulangé, M. Parquet, D. Grippois, V. Dorovska-Taran, and J.C. Martin. 2005. A *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289: H652-H659.
- Van Buren, A.T., A.D. Kulkarni, W.C. Fanslow, and F.B. Rudolph. 1985. Dietary nucleotides, a requirement for helper/inducer T lymphocytes. *Transplantation* 40(6): 694-697.
- van den Berg, J.J.M., N.E. Cook, and D.L. Tribble, 1995. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30: 599-605.
- Villeneuve, P., R. Lago, N. Barouh, B. Barea, G. Piompo, J.Y. Dupre, A.L. Guillou, and M. Pariza. 2005. Production of conjugated linoleic acid isomers by dehydration and isomerization of castor bean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82(4): 261-269.
- Waberski, D., A.M. Petrunkina, and E. Töpfer-Petersen. 2008. Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology* 70:1346-1351.
- Wahle, K.W.J., S.D. Heys, and D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lipid Res.* 43: 553-587.
- Wallach, E.E., R. Bronson, Y. Hamada, K.H. Wright, and V.G. Stersens. 1975. Effectiveness of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in restoration of HMG-HCG induced ovulation in indomethacin treated rhesus monkeys. *Prostaglandins* 10: 129-138.
- Wang, Y.W., and P.J. Jones. 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28: 941-955.
- Wang, L.S., Y.W. Huang, Y. Sugimoto, S. Liu, H.L. Chang, W. Ye, S. Shu, and Y.C. Lin. 2006a. Conjugated linoleic acid (CLA) up-regulates the estrogen-regulated cancer suppressor gene, protein tyrosine phosphatase  $\gamma$  (PTP $\gamma$ ), in human breast cells. *Anticancer Res.* 26: 27-34.
- Wang, Y.M., K. Nagao, N. Inoue, Y. Ujino, Y. Shimada, T. Nagao, T. Iwata, T. Kamegai, Y. Yamauchi-Sato, and T. Yanagita. 2006b. Isomer-specific anti-obese and hypolipidemic properties of conjugated linoleic acid in obese OLEF rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(2): 355-362.
- Wang, Y.H., X.F. Li, Y.X. Liang, B. Yang, and S.H. Zhang. 2007. Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 46: 20-25.

- Wargent, E., M.V. Sennit, C. Stocker, A.E. Mayes, L. Brown, J. O'Dowd, S. Wang, A.W.C. Einerhand, I. Mohede, J.R.S. Arch, and M.A. Cawthorne. 2005. Prolonged treatment of genetically obese mice with conjugated linoleic acid improves glucose tolerance and lowers plasma insulin concentration: possible involvement of PPAR activation. *Lipids Health Dis.* 4: 3. Doi:10.1186/1476-511X-4-3.
- Warwel, S., and R. Borgdorf. 2000. Substrate selectivity of lipases in the esterification of *cis/trans*-isomers and positional isomers of conjugated linoleic acid. *Biotechnol. Lett.* 22(14): 1151-1155.
- Wathes, D., D. Abayasekara, and R. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77: 190-201.
- Waylan, A.T., P.R. O'Quinn, J.A. Unruh, J.L. Nelsen, R.D. Goodband, J.C. Woodworth, M.D. Tokach, and S.I. Koo. 2002. Effects of modified tall oil and vitamin E on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 1575-1585.
- Weiler, U., and R. Claus. 1991. Endocrine aspects of testicular function, especially hormones in the seminal plasma and their fate in the female reproductive tract: testicular steroids and their relevance for male and female reproductive functions. *Reprod. Dom. Anim.* 1(Suppl.): 41-61.
- Wendel, A.A., A. Purushotham, L.F. Liu, and M.A. Belury. 2008. Conjugated linoleic acid fails to worsen insulin resistance but induces hepatic steatosis in the presence of leptin in *ob/ob* mice. *J. Lipid. Res.* 49: 98-106.
- West, D.B., J.P. Delany, P.M. Camet, F. Blohm, A.A. Truett, and J. Scimeca. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 275: R667-R672.
- West, D.B., F.Y. Blohm, A.A. Truett, and J.P. DeLany. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J. Nutr.* 130: 2471-2477.
- Wettemann, R.P., S. Welty, and D.K. Bishop. 1992. An attempt to stimulate sexual behavior of boars. Oklahoma Agriculture Experiment Station. Animal Science Report. 410-412.
- Whigham, L.D., M.E. Cook, and R.L. Atkinson. 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharm. Res.* 42(6): 503-510.
- Widowski, T.M., S.E. Curtis, P.J. Dziuk, W.C. Wagner, and O.D. Sherwood. 1990. Behavioral and endocrine responses of sows to prostaglandin F2 alpha and cloprostenol. *Biol. Reprod.* 43: 290-297.
- Wiegand, B.R., F.C. Parrish, Jr., J.E. Swan, S.T. Larsen, and T.J. Baas. 2001. Conjugated linoleic acid improves feed efficiency, decreases subcutaneous fat, and improves certain aspects of meat quality in stress-genotype pigs. *J. Anim. Sci.* 79: 2187-2195.
- Wiegand, B.R., J.C. Sparks, F.C. Parrish, Jr., and D.R. Zimmerman. 2002. Duration of feeding conjugated linoleic acid influences growth performance, carcass traits, and meat quality of finishing barrows. *J. Anim. Sci.* 80: 637-643.

- Wiesak, T., M.G. Hunter, and G.R. Foxcroft. 1992. Effect of prostaglandins on luteal function during early pregnancy in pigs. *J. Reprod. Fert.* 95: 831-840.
- Wilson, T.A., R.J. Nicolosi, M. Chrysam, and D. Kritchevsky. 2000. Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr. Res.* 20(12): 1795-1805.
- Wilson, P.W., R.B. D'Agostino, H. Parise, L. Sullivan, and J.B. Meigs. 2005. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 112: 3066-3072.
- Wilson, T.A., R.J. Nicolosi, A. Saati, T. Kotyla, and D. Kritchevsky. 2006. Conjugated linoleic acid isomers reduce blood cholesterol levels but not aortic cholesterol accumulation in hypercholesterolemic hamsters. *Lipids* 41(1): 41-48.
- Woltil, H.A., C.M. van Busekom, A.D. Siemensma, H.A. Polman, F. Musikiet, and A. Okken. 1995. Erythrocyte and plasma cholesterol ester long-chain polyunsaturated fatty acid of low birth weight babies fed preterm formula with and without ribonucleotides: comparison with human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 943-949.
- Xu, X., J. Storkson, S. Kim, K. Sugimoto, Y. Park, and M.W. Pariza. 2003. Short-term of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. *J. Nutr.* 133: 663-667.
- Xu, H., H.Y. Lee, B. Hwang, J.H. Nam, H.Y. Kang, and J. Ahn. 2008. Kinetic of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* 105: 2239-2247.
- Yamasaki, M., K. Mansho, Y. Ogino, M. Kasai, H. Tachibana, and K. Yamada. 2000a. Acute reduction of serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr. Biochem.* 11(9): 467-471.
- Yamasaki, M., K. Kishihara, K. Mansho, Y. Ogino, M. Kasai, M. Sugano, H. Tachibana, and K. Yamada. 2000b. Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(10): 2159-2164.
- Yamasaki, M., H. Chujo, Y. Koga, A. Oishi, T. Rikimaru, M. Shimada, K. Sugimachi, H. Tachibana, and K. Yamada. 2002. Potent cytotoxic effect of the *trans*10, *cis*12 isomer of conjugated linoleic acid on rat hepatoma dRLh-84 cells. *Cancer Lett.* 188(1-2): 171-180.
- Yamasaki, M., A. Ikeda, M. Oji, Y. Tanaka, A. Hirao, M. Kasai, T. Iwata, H. Tachibana, and K. Yamada. 2003a. Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-levels diets. *Nutrition* 19(1): 30-35.
- Yamasaki, M., H. Chujo, A. Hirao, N. Koyanagi, T. Okamoto, N. Tojo, A. Oishi, T. Iwata, Y. Yamauchi-Sato, T. Yamamoto, K. Tsutsumi, H. Tachibata, and K. Yamada. 2003b. 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.

- Yamauchi, K., A.A. Adjei, C.K. Ameho, Y.C. Chan, A.D. Kulkarni, S. Sato, K. Okamoto, and S. Yamamoto. 1996. Increase lymphoproliferative and delayed hypersensitivity responses in mice. *J. Nutr.* 126: 1571-1577.
- Yang, M., and M.E. Cook. 2003. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp. Biol. Med.* 228: 51-58.
- Yeung, C.H., L. Yang, Y. Huang, J. Wang, and Z.Y. Chen. 2000. Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in hamsters. *Br. J. Nutr.* 84: 935-941.
- Yotsumoto, H., E. Hara, S. Naka, R.O. Adolf, E.A. Emken, and T. Yanagita. 1999. *Trans*10, *cis*12-linoleic acid reduces apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *Food Res. Int.* 31: 403-409.
- Yu, V.Y. 1998. The role of dietary nucleotides in neonatal and infant nutrition. *Singapore Med. J.* 39(4): 145-150.
- Yu, Y., P.H. Correl, and J.P. Vanden Heuvel. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1581: 89-99.
- Yu, L., D. Adams, and B.A. Watkins, 2003. Comparison of commercial supplements containing conjugated linoleic acid. *J. Food Compos. Anal.* 16: 419-428.
- Yurawecz, M.P., J.K. Hood, M.M. Mossoba, J.A.G. Roach, and Y. Ku. 1995. Furan fatty acids determination as oxidation products of conjugated octadecadienoic acid. *Lipids* 30: 595-598.
- Zanini, S.F. G.L. Colnago, M.R. Basto, B.M.S. Pessotti, F.P. Casagrande, and V.R. Lima. 2006. Oxidative stability and total lipids on thigh and breast meat of broilers fed diets with sources and supplemented with conjugated linoleic acid. *LWT–Food Sci. Technol.* 39: 717-723.
- Zarco, L. 2006. Endocrinología de la reproducción. *In: Galina, C., y J. Valencia. (eds.). Reproducción de los Animales Domésticos. 2da. ed., Limusa, México D.F. pp 59-83.*
- Zhang, H., Y. Gou, and J. Yuan. 2005a. Conjugated linoleic acid enhanced the immune function in broiler chicks. *Br. J. Nutr.* 94: 746-752.
- Zhang, H., Y. Gou, and J. Yuan. 2005b. Effects of conjugated linoleic acids on growth performance, serum lysozyme activity, lymphocyte proliferation, and antibody production in broiler chicks. *Arch. Anim. Nutr.* 59(5): 293-301.
- Zhang, A., and Z.Y. Chen. 1997. Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1611-1613.





## **CAPITULO I. POTENCIAL DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (ALC) PARA MEJORAR LAS CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN Y MODIFICAR EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ESPERMATOZOIDE DEL CERDO**

### **Resumen**

El objetivo de este experimento fue evaluar el potencial de la adición del ácido linoleico conjugado (ALC) a la dieta de verracos para mejorar las características seminales, modificar el perfil de ácidos grasos del espermatozoide, y afectar las características de la canal y testiculares. Diez verracos de línea terminal (Yorkshire×Landrace×Pietrain) fueron distribuidos al azar a uno de dos tratamientos en un diseño completamente al azar; cada verraco fue una unidad experimental. Los tratamientos (T) fueron los siguientes: T1) Dieta testigo (sin adición de ALC; n=5), y T2) Dieta con 1% de ALC (n=5). Los verracos fueron eyaculados dos veces por semana durante el periodo experimental. Para determinar el perfil de ácidos grasos en los espermatozoides se utilizó el semen de las semanas 0 (inicio del experimento), 4, 8 y 12. Para determinar la cantidad y calidad del eyaculado se realizaron mediciones rutinarias. No se observaron cambios en el perfil de ácidos grasos de la célula espermática por el consumo de ALC durante 12 semanas. Tampoco, se observó efecto del consumo del ALC sobre la producción de semen (volumen), concentración, viabilidad, motilidad, y morfología anormal espermática. Sin embargo, el pH seminal fue ligeramente más elevado en el semen de los verracos que consumieron el ALC (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ). Con respecto a las características de la canal y testiculares, sólo la grasa dorsal (GD) fue afectada por el tratamiento, observándose un incremento (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) en la GD de los cerdos que consumieron la dieta adicionada con ALC. Los resultados obtenidos en el presente experimento indican que la adición de 1% de ALC a la dieta no mejora la producción ni la calidad del semen de cerdo; tampoco modifica el perfil de ácidos grasos del espermatozoide.

**Palabras clave:** ALC, calidad seminal, comportamiento reproductivo, espermatozoide, verracos.

## **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the potential of conjugated linoleic acid (CLA) addition to boar diet on semen production, semen characteristics, fatty acids profile of spermatozoa, and its effects on carcass and testis characteristics. Ten lean-type (Yorkshire×Landrace×Pietrain) adult boars were randomly assigned to two treatments in a completely randomized design (each boar was a replicate). Treatments (T) were as follows: T1) Control diet (without CLA addition; n=5), and T2) Diet with 1% of CLA (n=5). All boars were ejaculated twice per week during the experimental period. Semen was collected at 0 (at beginning of the experiment), 4, 8, and 12 weeks for spermatozoa fatty acids profile analysis. Classical measurements of sperm quantity and quality were performed. The results showed no effect from the dietary CLA on the spermatozoa fatty acid profile, up to 12 weeks of feeding. Also, no effect was observed on semen volume, sperm concentration, viability, motility, or abnormal sperm morphology. Nevertheless, the seminal pH was slightly higher in the boars fed with the CLA diet (linear effect,  $P \leq 0.05$ ). Regarding the carcass and testicular characteristics, only the backfat thickness (BFT) was affected by the treatment; a linear increase in BFT was detected ( $P \leq 0.05$ ) in boars fed CLA diet. The results indicate that feeding CLA (1% of the diet) to boars does not influence the semen characteristics or fatty acids profile of the spermatozoa. However, it increases the backfat thickness in mature sexually active boars.

**Keywords:** boars, CLA, reproductive performance, semen quality, spermatozoa.

## 1.1. Introducción

Actualmente, en la industria porcina la inseminación artificial es una práctica común, que tiene como objetivos: avanzar más rápido en el mejoramiento genético de las piaras y controlar la diseminación de enfermedades infecciosas (Thibier y Guerin, 2000; Robinson y Buhr, 2005; Roca *et al.*, 2006). Pero el éxito de esta práctica depende de la disponibilidad de semen de alta calidad, tanto en volumen seminal, morfología, motilidad y composición de nutrientes de los espermatozoides (Thibier y Guerin, 2000; Waberski *et al.*, 2008).

Estudios realizados en semen porcino han determinado que la membrana plasmática de la célula espermática del cerdo está compuesta por una elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (Poulos *et al.*, 1973; Poulos *et al.*, 1986; Weibel *et al.*, 2007), principalmente por los ácidos grasos 22:5 (n-6) y 22:6 (n-3; Johnson *et al.*, 1969, 1972; Poulos *et al.*, 1973; Evans y Setchell, 1979; Paulenz *et al.*, 1995; Paulenz *et al.*, 1999; Cerolini *et al.*, 2001; Rooke *et al.*, 2001; Mitre *et al.*, 2004; Maldjian *et al.*, 2005). La elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados en el espermatozoide, sugiere que dicha característica puede estar relacionada con la fluidez de la membrana (Stubbs y Smith, 1984; Aitken, 1995), y ésta a su vez puede ser correlacionada con la fertilidad de los gametos (Cerolini *et al.*, 2000; Rooke *et al.*, 2001; Blesbois *et al.*, 2004). Se han realizado estudios en los cuales se han evaluado los efectos de la adición de ácidos grasos n-3 a la dieta sobre la calidad del semen porcino sin obtener resultados concretos (Paulenz *et al.*, 1995; Rooke *et al.*, 2001; Mitre *et al.*, 2004; Strzeżek *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2006; Estienne *et al.*, 2008). El ALC son un grupo de ácidos grasos a los cuales se les han atribuido diversas propiedades benéficas para la salud de los animales; sin embargo, hasta el momento no se ha realizado ningún estudio en el cual se hayan evaluado los efectos de la adición de este tipo de ácidos grasos a la dieta sobre las características del semen de cerdo.

El término ácido linoleico conjugado (ALC) se refiere a una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados, isómeros posicionales (C6, C8; C7, C9; C8, C10; C9, C11; C10, C12; C11, C13; y C12, C14) y geométricos (*cis*, *trans*; *trans*, *cis*; *cis*, *cis*; y *trans*, *trans*) del ácido linoleico (C18:C2), los cuales tienen un sistema de dobles enlaces conjugados, sin estar separados por un grupo metileno (Eulitz *et al.*, 1999). El término ALC incluye un total de 28

isómeros geométricos y posicionales (Collomb *et al.*, 2006), de los cuales 21 han sido identificados en los alimentos.

En la práctica, el ALC es una mezcla de todos estos isómeros geométricos y posicionales; y los productos de origen animal, principalmente provenientes de rumiantes, son los que tienen un mayor contenido de ALC (Chin *et al.*, 1992; Schmid *et al.*, 2006). De todos los isómeros se ha encontrado que el isómero biológicamente más activo y abundante es el *cis*9, *trans*11 (Pariza *et al.*, 2000); aunque, también se ha reportado que el isómero *trans*10, *cis*12 tiene una actividad biológica importante (Kramer *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999a; Park *et al.*, 1999b).

Entre las propiedades que se le han atribuido al ALC, se ha reportado que posee actividad anticarcinogénica (Ha *et al.*, 1989; Ip *et al.*, 1996; Devery *et al.*, 2001; Pariza *et al.*, 2001), antiaterogénica (Lee *et al.*, 1994; Nicolosi *et al.*, 1997), antidiabetogénica (Houseknecht *et al.*, 1998; Moloney *et al.*, 2007), además de tener la propiedad de modificar la composición corporal (Chin *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1997; Ostrowska *et al.*, 1999), regular el metabolismo energético y la respuesta inmune (Cook *et al.*, 1993; Sugano *et al.* 1998; Hayek *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2000; Kelley *et al.*, 2002; Kelley y Erickson, 2003); además de poseer propiedades antioxidantes (Ha *et al.*, 1990; Du *et al.*, 2000; Hur *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2002) y pro-oxidantes (Chen *et al.*, 1997; Flintoff-Dye y Omaye, 2005; Martin *et al.*, 2008a; Martin *et al.*, 2008b) en condiciones específicas. Sin embargo, la información sobre sus efectos en la reproducción en animales domésticos es limitada, y ha sido enfocada principalmente a hembras (Aydin y Cook, 2004; Park *et al.*, 2005; Castañeda-Gutiérrez *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2007; Leone *et al.*, 2010). Por lo anterior, los objetivos de este experimento fueron evaluar el efecto de la adición de ALC a la dieta para verracos sobre las características del semen, perfil de ácidos grasos del espermatozoide del cerdo; así como determinar sus efectos sobre algunas características de la canal y el testículo.

## **1.2. Materiales y métodos**

Esta investigación se realizó en la granja experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, localizada en el municipio de Texcoco, Estado de México. Geográficamente se localiza a 98° 48' 27" de longitud oeste y a 19° 48' 23" de latitud norte, a

una altura de 2241 msnm (García, 1988). El estudio se realizó durante los meses de octubre de 2008 a enero de 2009. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el periodo experimental dentro de las instalaciones fueron: 26, -3, y 13.5 °C, respectivamente.

### **Animales y tratamientos**

Diez verracos de línea terminal (Yorkshire×Landrace×Pietrain) con un peso promedio de 232±12.3 kg y una edad aproximada de 23 meses, fueron distribuidos en un diseño completamente al azar de dos tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento, durante 12 semanas (periodo experimental). Los verracos se alojaron individualmente en corrales de 2.0×2.4 m (4.80 m<sup>2</sup>), con piso de concreto, equipados con bebederos de chupón. Los animales tuvieron libre acceso al agua. La alimentación fue restringida, ofreciendo 2.8 kg d<sup>-1</sup> en el piso del corral. Durante los periodos pre-experimental y experimental, la limpieza de los corrales y animales, e inspección de salud se realizó diariamente.

Después de un periodo de manejo pre-experimental de cuatro semanas, los verracos fueron asignados a uno de los dos tratamientos experimentales. Durante el periodo pre-experimental los verracos fueron alimentados con la dieta testigo; posteriormente fueron alimentados con las dietas experimentales hasta finalizar el experimento.

Los tratamientos evaluados fueron dos niveles de ALC (0 y 1%; BASF Mexicana S.A. de C.V.) en dietas estándar para verracos (Cuadro 7). Las dietas se formularon con base en sorgo-pasta de soya y fueron adicionadas con aminoácidos sintéticos (L-lisina·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DL-metionina y L-treonina). La adición de lisina, treonina, y metionina se realizó hasta alcanzar los niveles recomendados por Reese *et al.* (2000). Además, las dietas fueron formuladas para cubrir el requerimiento de proteína cruda (13%) y energía metabolizable (3.265 Mcal kg<sup>-1</sup>) recomendado por el NRC (1998).

### **Colección de semen**

Los verracos fueron eyaculados dos veces por semana; cuatro semanas antes de iniciar el experimento y durante 12 semanas a partir de que comenzaron a consumir las dietas experimentales. El semen fue colectado usando la técnica de mano enguantada (Hancock y Hovell, 1959); los verracos fueron eyaculados durante todo el periodo experimental por la misma persona. Después de la eyaculación de cada verraco se registró el volumen total de la

fracción rica en espermatozoides y el peso de la fracción gelatinosa. La fracción rica en espermatozoides fue separada de la fracción gelatinosa utilizando bolsas de colección para semen para verracos con filtro (US Bag™ System, Cat. no. 11123/0100, Minitube, México.). El semen fue mantenido a 37 °C en un baño María durante su evaluación en el laboratorio de la granja experimental.

### **Evaluación del semen**

La concentración espermática por mililitro se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Para realizar el conteo de espermatozoides, el semen fue diluido en una relación de 1:200 con una solución de citrato de sodio al 3%, con formol (3 mL de formol en 1000 mL de agua bidestilada). Se contaron los espermatozoides presentes en 5 de los 25 cuadros de la cámara de Neubauer (Ax *et al.*, 2000). La concentración espermática total se obtuvo multiplicando la concentración por mililitro por el volumen total de la fracción rica en espermatozoides.

La motilidad espermática se evaluó colocando una gota de semen en un portaobjetos atemperado a 37 °C, el cual fue observado en un microscopio óptico a 400x. La motilidad espermática total fue determinada como el porcentaje de espermatozoides que presentaron algún signo de motilidad o movimiento en dos áreas de medición al contar 100 células por área (Rodríguez-Gil y Rigau, 1995).

El pH del semen fue medido en una muestra de semen de 20 mL, inmediatamente después de la eyaculación de cada verraco utilizando un potenciómetro portátil (Orion, Modelo: 265, Orion Research, Inc. Alemania).

### **Viabilidad y morfología espermática**

La evaluación de la viabilidad espermática se realizó por medio de frotis de semen teñido con eosina-nigrosina (Bamba, 1988; Tardif *et al.*, 1999); la morfología espermática fue evaluada por medio de frotis de semen teñido con rosa de bengala. Las mezclas de semen con las tinciones fueron incubadas por 2 min a 37 °C antes de realizar los frotis en los portaobjetos; posteriormente se dejaron secar. Los frotis teñidos con eosina-nigrosina y rosa de bengala fueron evaluados contando 200 espermatozoides por frotis en un microscopio óptico a 400x. Los espermatozoides viables fueron definidos como aquellos que no se tiñeron.

En la evaluación de la morfología espermática se cuantificó la proporción de espermatozoides con anomalías de cabeza (suelta, macrocabezas, microcabezas, piriformes), colas (enrolladas, dobladas, quebradas, dobles colas), pieza media, y presencia de gotas citoplasmáticas (proximal, distal, parcialmente desprendida; Sorensen, 1979).

### **Características de la canal y testiculares**

Al inicio del experimento (semana 0) y en las semanas 4, 8 y 12 del periodo experimental, se midió la grasa dorsal y el área del músculo *Longissimus* al nivel de la décima costilla. Adicionalmente se midió el área transversal de los testículos, aproximadamente a la mitad del testículo, utilizando un ultrasonido de tiempo real Sonovet 600 (Medison, Inc., Cypress, California, EUA).

### **Análisis de laboratorio**

Muestras de células espermáticas de cada uno de los verracos fueron tomadas en las semanas 0 (inicio del experimento), 4, 8 y 12 del experimento. El semen de cada verraco fue centrifugado a 1500 g durante 20 min a 4 °C para separar las células espermáticas del plasma seminal. Posteriormente, las células espermáticas fueron re-suspendidas a 50 mL con una solución que contenía BTS™ (Beltsville Thawing Solution; Minutube, Querétaro, México) para ser re-centrifugadas. Los espermatozoides lavados fueron guardados a -20 °C hasta realizar el análisis de ácidos grasos.

El contenido total de lípidos de las células espermáticas, aceites y dietas fue determinado de acuerdo al método 923.07 de la AOAC (2000). Los lípidos totales de cada muestra junto con 1 mL de ácido miristoleico (estándar interno; Cat. no. M3525, Sigma-Aldrich Co., USA) fueron saponificados con 2 mL de sosa metanólica al 2%, durante 10 min a 90 °C en baño María. La metilación se realizó adicionando 1 mL de solución de trifluoruro de boro-metanol al 20% (Cat. no. B1252, Sigma-Aldrich Co., USA), incubándose durante 2 min a 90 °C en baño María; se dejó enfriar y se adicionaron 5 mL de heptano (Cat. no. 270412, Sigma-Aldrich Co., USA), y se dejó ebullición por 2 min a 90 °C en baño María. Posteriormente se adicionaron 5 mL de una solución saturada de cloruro de sodio al 25%; una vez que se separaron las fases de agua y heptano, la fase que contenía el heptano se pasó a un tubo de



ensayo y fue evaporada con nitrógeno en baño María a 60 °C. El resultante se reconstituyó con 1 mL de hexano grado HPLC (Cat. no. H-9379-1; Sigma-Aldrich Co., USA).

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos (ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, y los isómeros *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12 del ALC) se realizó por cromatografía de gases en un equipo Varian 3400 CX (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), con auto-muestreador 8400 y detector de ionización de flama; la columna utilizada fue una DB23 (30 m × 0.25 mm d.i.; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), utilizando N<sub>2</sub> como gas acarreador a un flujo de 30 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas de operación de la columna, inyector y detector fueron de 230, 150 y 300 °C, respectivamente. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron por sus tiempos de retención relativos a una mezcla de estándares (FAME mix C4–C24 no. 18919-1 AMP, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA; *cis*-4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid, Cat. no.18566-10MG (Fluka), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Los isómeros del ácido linoleico conjugado (ALC) fueron identificados utilizando un estándar de ésteres metílicos de ALC que contenían una mezcla de los ácidos octadecadienoicos: *cis*-9, *trans*-11; *trans*-9, *cis*-11; *trans*-10, *cis*-12; *cis*-10, *trans*-12 (Cat. no. 05632, Sigma-Aldrich Co., USA). La concentración de los ácidos grasos de las muestras se calculó utilizando el área de cada pico con relación al área conocida del estándar. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en la Ciudad de México, México.

Las dietas experimentales fueron analizadas en el laboratorio para determinar la concentración de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990); energía bruta en una bomba calorimétrica adiabática (Oxygen Bomb Calorimeter, Parr Instruments Co. Illinois, EUA), siguiendo la metodología propuesta por Tejada (1992); calcio por espectrofotometría de absorción atómica (Espectrofotómetro Varian SpectrAA 10 plus, Varian, Australia), y fósforo total por espectrofotometría de absorción de rayos UV (Espectrofotómetro Varian Cary 1E UV-vis, Varian, Australia), siguiendo las metodologías de Fick *et al.* (1979). Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal, Campus Montecillo, del Colegio de Posgraduados.

### **Análisis estadístico**

Las anormalidades espermáticas individuales se sumaron para obtener un solo valor de células espermáticas con anormalidades por eyaculado. El perfil de ácidos grasos de las células espermáticas, características seminales, características de la canal y testiculares fueron analizadas con el procedimiento MIXED de SAS (West *et al.*, 2007; SAS, 2009). Los valores iniciales del perfil de ácidos grasos de las células espermáticas, de las características seminales, de la canal y testiculares fueron usados como covariables. Para determinar el efecto del tiempo de consumo de la dieta, y de la interacción entre la dieta y el tiempo, se utilizaron polinomios ortogonales lineares y cuadráticos (Steel *et al.*, 1997).

### **1.3. Resultados**

#### **Perfil de ácidos grasos de aceites y dietas experimentales**

En el cuadro 8 se muestra el perfil de ácidos grasos del aceite crudo de soya y ALC. El análisis del perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales (Cuadro 9), muestra que la dieta con 1% de ALC, proporcionó 7.84 y 7.84% de los isómeros *cis*9, *trans*11 y *trans*10, *cis*12 respectivamente. En la dieta testigo no fueron detectados estos isómeros.

#### **Características seminales**

Las características macro y microscópicas seminales se muestran en el cuadro 10. El volumen del semen incrementó de la semana 4 a la 8, presentando una reducción en la semana 12 del experimento (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ). Los cambios en el volumen de semen afectaron la concentración espermática por mL, observándose una mayor concentración espermática por mL al disminuir el volumen de semen (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ; efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ). Por otro lado, la concentración espermática total experimentó una mejora durante el periodo experimental (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ); observándose un mayor incremento de la concentración total espermática en los cerdos que consumieron la dieta testigo (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ). La viabilidad espermática mejoró (efecto cuadrático,  $P \leq 0.01$ ), mientras que la cantidad de células con morfología anormal disminuyó (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ) a través del tiempo. En cuanto al pH seminal, el consumo de ALC mantuvo el pH seminal más estable; aunque, a través del tiempo, en los dos tratamientos se observó una disminución del pH

seminal (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ); el pH seminal de los verracos que no consumieron el ALC experimentó una mayor disminución (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ).

### **Perfil de ácidos grasos en células espermáticas**

El perfil de ácidos grasos de los espermatozoides al inicio y durante el experimento, se presenta en el cuadro 11. La concentración total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados no fue afectada por ninguno de los factores principales ( $P > 0.05$ ). Durante el periodo experimental la concentración de los ácidos eicosatrienoico ( $P \leq 0.01$ ), araquidónico ( $P \leq 0.01$ ), docosahexaenoico ( $P \leq 0.05$ ), y la concentración total de ácidos grasos de la serie n-3 ( $P \leq 0.05$ ) presentaron un efecto cuadrático, observándose una disminución de estos ácidos grasos en la semana 8, con un incremento de su concentración en la semana 12 a valores similares o cercanos a los presentes en la cuarta semana; mientras que la concentración total de ácidos n-6 (efecto lineal y cuadrático,  $P \leq 0.05$ ), aumentó a través del tiempo. Por otro lado, la relación entre los ácidos grasos n-6 y n-3 (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ), y la relación entre el ácido docosapentaenoico y docosahexaenoico (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ), mostraron el mismo comportamiento que los ácidos grasos totales de la serie n-6.

### **Características de la canal y testiculares**

En cuanto a las características de la canal y testiculares (cuadro 12), el consumo de ALC aumentó linealmente ( $P \leq 0.05$ ) el espesor de la grasa dorsal; sin embargo, se observó que esta característica de la canal incrementó en ambos tratamientos durante el transcurso del experimento (efecto lineal y cuadrático,  $P \leq 0.05$ ), pero con menor intensidad en los cerdos que consumieron la dieta testigo. Por otro lado, el AML aumentó (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) sólo por efecto del tiempo. En cuanto al área transversal testicular, aunque ésta característica no fue afectada por el consumo del ALC ( $P > 0.05$ ), se observó que el área del testículo derecho (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ) e izquierdo (efecto cuadrático  $P \leq 0.05$ ), aumentó durante el periodo experimental.

## **1.4. Discusión**

En este experimento se asumió que un periodo de 12 semanas de consumo de las dietas sería suficiente para observar y confirmar los efectos del consumo del ALC sobre la calidad espermática y obtener la máxima incorporación de ácidos grasos de cadena larga en la

membrana plasmática del espermatozoide; lo anterior está respaldado por el tiempo de duración de la espermatogénesis (34 a 39 d; Swierstra, 1968) y el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo (9 a 12 d; Swierstra, 1968; França *et al.*, 2005) en los cerdos, y a que se ha visto que en la mayoría de las especies animales el perfil de ácidos grasos en el espermatozoide y semen refleja el consumo de ácidos grasos (Lands, 2005; Wathes *et al.*, 2007); específicamente en cerdos se ha reportado que hay una transferencia efectiva de los ácidos grasos de la dieta a las células germinales (Maldjian *et al.*, 2003; Strzeżek *et al.*, 2004). Aunque no se observaron cambios en el perfil de ácidos grasos y en las características seminales por el consumo del ALC, el análisis del perfil de ácidos grasos de los espermatozoides concuerda con estudios previos realizados en semen de cerdo, en los cuales se ha encontrado que los ácidos grasos 22:5 (n-6) y 22:6 (n-3) son los más abundantes, aunque existen diferencias en la concentración de estos ácidos grasos en las células espermáticas en los diferentes reportes. Algunos autores indican que las células espermáticas tienen las siguientes concentraciones de los ácidos grasos 22:5 (n-6) y 22:6 (n-3): 39 y 25% (Johnson *et al.*, 1969), 36 y 23% (Johnson *et al.*, 1972), 28 y 38 % (Poulos *et al.*, 1973), 24 y 43% (Evans y Setchell, 1979), 11 y 29% (Paulenz *et al.*, 1995), 11 y 26% (Paulenz *et al.*, 1999), 31 y 29% (Cerolini *et al.*, 2001), 13 y 14% (Rooke *et al.*, 2001), 8 y 18% (Mitre *et al.*, 2004), 31 y 29% (Maldjian *et al.*, 2005) respectivamente. Al inicio del presente experimento, la concentración de los ácidos grasos 22:5 (n-6) y 22:6 (n-3) en las células espermáticas fue de 22 y 15%, respectivamente, no observándose cambios en la concentración de estos ácidos grasos después de 12 semanas de consumo de ALC.

Las diferencias en el perfil de ácidos grasos encontradas en los diferentes reportes pueden ser explicadas por la presencia de ácidos grasos unidos al glicerol por enlaces éter (Evans *et al.*, 1980; Brouwers *et al.*, 1998; Leßig, *et al.*, 2004). En el presente experimento, debido al procedimiento de derivatización de ácidos grasos utilizado, no se determinó la cantidad de ácidos grasos con unión éter. Pero se ha cuantificado que el 60% de la fosfatidilcolina presente en el espermatozoide del cerdo tiene ácidos grasos con unión éter en la posición sn-1; siendo los ácidos grasos saturados (principalmente ácido palmítico) los que están unidos por enlaces éter; mientras que los ácidos grasos poliinsaturados están en la posición sn-2 del glicerol (Brouwers *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio no se encontró

cambio en el perfil de ácidos grasos por efecto del consumo de ALC, lo que indica que la esterificación de ácidos grasos en la posición sn-2 o en los ácidos grasos con unión éster o éter no fue afectada.

La baja concentración del ácido graso 22:6 (n-3) en las células espermáticas puede deberse a la edad de los cerdos, pues se ha reportado que en aves (Cerolini *et al.*, 1997; Kelso *et al.*, 1997b; Douard *et al.*, 2003) y bovinos (Kelso *et al.*, 1997a) la edad está relacionada con cambios en el perfil de ácidos grasos del espermatozoide y calidad seminal. En gallos, se ha reportado que la edad disminuye la concentración de los ácidos grasos 22:4 (n-6) y 22:6 (n-3), así como la fertilidad y motilidad del espermatozoide. En toros, el cambio en el perfil de ácidos grasos del espermatozoide, principalmente por la reducción en la concentración del ácido graso 22:6 (n-3), ha sido relacionado con disminución en la concentración espermática y motilidad. Esta reducción en la concentración del 22:6 (n-3) puede ser debida a una disminución en las enzimas desaturadas (Brenner, 1989; Kelso *et al.*, 1997a). A pesar de estas aseveraciones, la motilidad espermática en el presente experimento es elevada y la concentración espermática por centímetro cúbico se puede considerar normal.

En cuanto a las características seminales, la producción de semen, concentración espermática por mL, viabilidad, motilidad y morfología anormal no fueron afectadas por el consumo del ALC durante el periodo experimental; sin embargo, el aumento en la concentración espermática, viabilidad, y disminución de la morfología anormal puede estar relacionado con cambios estacionales en la temperatura, pues se ha reportado que durante los meses más frescos del año se mejora la concentración espermática y producción de semen (Kunavongkrit y Prateep, 1995; Ciereszko *et al.*, 2000), mientras que las anomalías espermáticas son menores en cerdos mantenidos en temperaturas ambientales frescas (McNitt y First, 1970; Larsson y Einarsson, 1984). Aunque el pH seminal fue el único afectado por la dieta y el tiempo, esto indica que el consumo de ALC puede afectar la secreción de la próstata, vesículas seminales y glándula de Cowper; es decir, el ALC ayudaría a mantener en buenas condiciones de salud estas glándulas (Ciereszko *et al.*, 2000).

La mayor acumulación de grasa dorsal observada en los cerdos que consumieron la dieta con ALC, contradice lo encontrado en animales en crecimiento (Poulos *et al.*, 2001; Rahman

*et al.*, 2001) o adultos (Mirand *et al.*, 2004). Con respecto al AML, los resultados concuerdan con lo encontrado por Mirand *et al.* (2004), los cuales indican que el consumo de ALC en animales adultos no modifica la composición corporal. Por otro lado, el aumento del área transversal de los testículos durante el periodo experimental puede ser debido al incremento en la producción de semen.

## **1.5. Conclusiones**

En conclusión, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente experimento, la adición de 1% de ácido linoleico conjugado a la dieta de verracos no afecta la producción o calidad del semen ni modifica el perfil de ácidos grasos del espermatozoide; sin embargo, incrementa la grasa dorsal en verracos maduros sexualmente activos.

Además, de acuerdo a la revisión de literatura, este es el primer estudio en el cual se investiga el efecto del consumo de ALC sobre las características seminales y perfil de ácidos grasos del espermatozoide en cerdos adultos reproductivamente activos.

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304-2008 del Colegio de Postgraduados. Agradecemos a la Dra. Adelfa del Carmen García Contreras, de la Universidad Autónoma Metropolitana, por la donación de los verracos para la realización de esta investigación, y a BASF Mexicana S.A. de C.V., por la donación del ácido linoleico conjugado. También queremos hacer extensivo nuestro agradecimiento a la M.C. Silvia Carrillo y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán, por su apoyo en el análisis del perfil de ácidos grasos.

## 1.6. Literatura citada

- Aitken, R.J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fert. Develop.* 7: 659-668.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Arlington (VA): Association of Official Analytical Chemists. 1298 p.
- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists. 556 p.
- Ax, R.L., M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2000. Semen Evaluation. *In: Hafez, E.S.E., and B. Hafez (eds.). Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Wiley-Blackwell. Baltimore, USA. pp. 365-375.
- Aydin, R., and M.E. Cook. 2004. The effects of dietary conjugated linoleic acid on egg yolk fatty acids and hatchability in Japanese Quail. *Poult. Sci.* 83: 2016-2020.
- Bamba, K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29(6): 1245-1251.
- Blesbois, E., V. Douard, M. Germain, and P. Boniface. 2004. Effect of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology* 61: 537-549.
- Brenner, R.R. 1989. Factors affecting chain elongation and desaturation. *In: Vergroesen A.J., and M.A. Crawford (eds.). The Role of Fats in Human Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp. 45-80.
- Brouwers, J.F.H.M., B.M. Gadella, L.M.G. van Golde, and A.G.M. Tielens. 1998. Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. *J. Lipid Res.* 39: 344-353.
- Castañeda-Gutiérrez, E., B.C. Benefield, M.J. de Veth, N.R. Santos, R.O. Gilbert, W.R. Butler, and D.E. Bauman. 2007. Evaluation of the mechanisms of action of conjugated linoleic acid isomer on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 4253-4264.
- Cerolini, S., K.A. Kelso, R.C. Noble, B.K. Speake, F. Pizzi, and L.G. Cavalchini. 1997. Relation between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol. Reprod.* 57: 976-980.
- Cerolini, S., A. Maldjian, P. Surai, and R. Noble. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 99-111.
- Cerolini, S., A. Maldjian, F. Pizzi, and T.M. Gliozzi. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121: 395-401.
- Chen, Z.Y., P.T. Chan, K.Y. Kwan, and A. Zhang. 1997. Reassess of the antioxidant activity of conjugated linoleic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 749-753.

- Chin, S.F., W. Lui, J.M. Storkson, Y.L. Ha, and M.W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5: 185-197.
- Ciereszko, A., J.S. Ottobre, and J. Glogowski. 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci.* 64: 89-96.
- Collomb, M., A. Schimid, R. Sieber, D. Wechsler, and E.L. Ryhänen. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: variations and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16: 1347-1361.
- Cook, M.E., C.C. Miller, Y. Park, and M.W. Pariza. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult. Sci.* 72: 1301-1305.
- de Oliveira, S.L., E.T. Fialho, L.D. Solis, J.A. de Freitas, R.T. Fonseca, and M.G. Zangeronimo. 2006. The effect of the inclusion of different types of oil in the diet of boars on the quality of semen in natura. *Ciênc. Agrotec. Lavras* 30(6): 1205-1210.
- Devery, R., A. Miller, and C. Stanton. 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 29(2): 341-344.
- Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, and E. Blesbois. 2003. Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in Turkeys. *Theriogenology* 59: 753-764.
- Du, M., D.U. Ahn, K.C. Nam, and J.L. Sell. 2000. Influence of dietary conjugated linoleic acid on volatile profiles, color and lipid oxidation of irradiated raw chicken meat. *Meat Sci.* 56: 387-395.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, and R.J. Crawford. 2008. Dietary supplementation with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. *Theriogenology* 70: 70-76.
- Eulitz, K., M.P. Yurawecz, N. Sehat, J. Fritsche, J.A.G. Roach, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, R.O. Adlof, and Y. Ku. 1999. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8,10-through 11,13-18:2. *Lipids* 34(8): 873-877.
- Evans, R.W., and B.P. Setchell. 1979. Lipid changes in boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations on the flow and composition of boar rete testis fluid. *J. Reprod. Fert.* 57: 189-196.
- Evans, R.W., D.F. Weaver, and E.D. Clegg. 1980. Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa. *J. Lipid Res.* 21: 223-228.
- Fick, K.R., L.R. McDowell, R.H. Miles, N.S. Wilkins, J.D. Funk, and J.H. Conrad. 1979. *Methods of Mineral Analysis of Plant and Animal Tissues*. 2nd ed. Animal Science Department, University of Florida, Gainesville, FL. USA. 763 p.



- Flintoff-Dye, N.L., and S.T. Omaye. 2005. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. *Nutr. Res.* 25: 1-12.
- França, L.R., G.F. Avelar, and F.F.L. Almeida. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs, *Theriogenology* 63: 300-318.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koëppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p. 27.
- Ha, Y.L., N.K. Grimm, and M.W. Pariza. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification in natural and processed cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 37(1): 75-81.
- Ha, Y.L., J. Storkson, and M.W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50: 1097-1101.
- Hancock, J.L., and G.J.R. Hovell. 1959. The collection of boar semen. *Vet. Rec.* 71: 664-665.
- Hayek, M.G., S.N. Han, D. Wu, B.A. Watkins, M. Meydani, J.L. Dorsey, D.E. Smith, and S.N. Meydani. 1999. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. *J. Nutr.* 32: 32-38.
- Houseknecht, K.L., J.P.V. Heuvel, S.Y. Moya-Camarena, C.P. Portocarrero, L.W. Peck, K.P. Nickel, and M.A. Belury. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty *fafa* rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224(3): 678-682.
- Hur, S.J., G.B. Park, and S.T. Joo. 2007. A comparison of the effects of dietary conjugated linoleic acid contents, cholesterol, lipid oxidation and drip loss in pork loin and chicken breast. *J. Muscle Foods* 18: 264-275.
- Ip, C., S.P. Briggs, A.D. Haegele, H.J. Thompson, J. Storkson, and J.A. Scimeca. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17(5): 1045-1050.
- Johnson, L.A., R.J. Gerrits, and E.P. Young. 1969. The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. *Biol. Reprod.* 1: 330-334.
- Johnson, L.A., V.G. Pursel, and R.J. Gerrits. 1972. Total phospholipid and phospholipid fatty acids of ejaculated and epididymal semen and seminal vesicle fluids of boars. *J. Anim. Sci.* 35(2): 398-403.
- Joo, S.T., J.I. Lee, Y.L. Ha, and G.B. Park. 2002. Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition, lipid oxidation, color, and water-holding capacity of pork loin. *J. Anim. Sci.* 80: 108-112.
- Kelley, D.S., J.M. Warren, V.A. Simon, G. Bartolini, B.E. Mackey, and K.L. Erickson. 2002. Similar effects of *c9,t11*-CLA and *t10,c12*-CLA on immune cell functions in mice. *Lipids* 37(7): 725-728.

- Kelley, D.S., and K.L. Erickson. 2003. Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal model: benefits vs. risks. *Lipids* 38(4): 377-386.
- Kelso, K.A., A. Redpath, R.C. Noble, and B.K. Speake. 1997a. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *J. Reprod. Fertil.* 109: 1-6.
- Kelso, K.A., S. Cereloni, B.K. Speake, L.G. Cavalchini, and R.C. Noble. 1997b. Effects of dietary supplementation with  $\alpha$ -linoleic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* 110: 53-59.
- Kramer, J.K.G., N. Sehat, M.E.R. Dugan, M.M. Mossoba, M.P. Yurawecz, J.A.G. Roach, K. Eulitz, J.L. Aalhus, A.L. Schaefer, and Y. Ku. 1998. Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pig fed commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 33:5 49-558.
- Kunavongkrit, A., and P. Prateep. 1995. Influence of ambient temperature on reproductive efficiency in pigs: 1. Boar semen quality. *Pig J.* 35: 43-47.
- Lands, W.E. 2005. Long-term fat intake and biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 721S-725S.
- Larsson, K., and S. Einarsson. 1984. Seminal changes in boars after heat stress. *Acta Vet. Scand.* 25: 57-66.
- Lee, K.N., D. Kritchevsky, and M.W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108: 19-25.
- Leone, V.A., S.P. Worzalla, and M.E. Cook. 2010. Evidence that maternal conjugated linoleic acid negatively affects lipid uptake in late-stage chick embryos resulting in increased embryonic mortality. *Poult. Sci.* 89(4): 621-632.
- Leßig, J., C. Gey, R. Süß, J. Schiller, H.J. Glander, and J. Arnhold. 2004. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Comp. Biochem. Physiol.-B: Biochem. Mol. Biol.* 137(2): 265-277.
- Maldjian, A., P. Penny, and R. Noble. 2003. Docosahexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. *In: Vriese, S. R. D., and A. B. Christophe (eds.). Male Fertility and Lipid Metabolism.* AOCS Press, Champaign, Illinois, USA. pp. 60-72.
- Maldjian, A., F. Pizzi, T. Gliozzi, S. Cerolini, P. Penny, and R. Noble. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63: 411-421.
- Mann, G.E., A.L. Lock, D.E. Bauman, and N.R. Kendall. 2007. Reproductive function in dairy cows fed a lipid encapsulated conjugated linoleic acid supplement. *J. Anim. Sci.* 85 (Suppl. 1): 401 (Abstr.).

- Martin, D., E. Muriel, T. Antequera, T. Perez-Palacios, and J. Ruiz. 2008a. Fatty acid composition and oxidative susceptibility of fresh loin and liver from pigs fed conjugated linoleic acid in combination with monounsaturated fatty acids. *Food Chem.* 108(1): 86-96.
- Martin, D., T. Antequera, E. Muriel, A.I. Andres, and J. Ruiz. 2008b. Oxidative changes of fresh loin from pig, caused by dietary conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids during refrigerated storage. *Food Chem.* 111(3): 730-737.
- McNitt, J.I., and N.L. First. 1970. Effects of 72-hours heat stress on semen quality in boars. *Int. J. Biometeorol.* 14: 373-380.
- Mirand, P.P., M.A. Arnal-Bagnard, L. Mosoni, Y. Faulconnier, J.M. Chardigny, and Y. Chilliard. 2004. *Cis-9, trans-11* and *trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid isomers do not modify body composition in adult sedentary or exercised rats. *J. Nutr.* 134: 2263-2269.
- Mitre, R., C. Cheminade, P. Allaume, P. Legrand, A.B. Legrand. 2004. Oral intake of shark oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. *Theriogenology* 62: 1557-1566.
- Moloney, F., S. Toomey, E. Noone, A. Nugent, B. Allan, C.E. Loscher, and H.M. Roche. 2007. Antidiabetic effects of *cis-9, trans-11*-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes* 56: 574-582.
- Nicolosi, R., E.J. Rogers, D. Kritchevsky, J.A. Scimeca, and P.J. Huth. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and artery aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22(5): 266-277.
- NRC (National Research Council). 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington, D.C., USA. p. 123.
- Ostrowska, E., M. Muralitharan, R.F. Cross, D.E. Bauman, and F.R. Dunshea. 1999. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J. Nutr.* 129: 2037-2042.
- Pariza, M.W., Y. Park, and M.E. Cook. 2000. Mechanism of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 8-13.
- Pariza, M.W., Y. Park, and M.E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40: 283-298.
- Park, Y., K.J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M.E. Cook, and M.W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32: 853-858.
- Park, Y., J.M. Storkson, K.J. Albright, W. Liu, and M.W. Pariza. 1999a. Evidence that the *trans-10, cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34: 235-241.
- Park, Y., K.J. Albright, J.M. Storkson, W. Liu, M.E. Cook, and M.W. Pariza. 1999b. Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* 34: 243-248.

- Park, J.C., Y.H. Kim, H.J. Jung, H.K. Moon, O.S. Kwon, and B.D. Lee. 2005. Effects of dietary supplementation of conjugated linoleic (CLA) on piglets' growth and reproductive performance in sows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18(2): 249-254.
- Paulenz, H., O. Taugbø, P.O. Hofmo, and K. Saarem. 1995. A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver on polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. *Vet. Res. Commun.* 19: 264-269.
- Paulenz, H., O. Taugbø, E. Kommisrud, and I.S. Grevle. 1999. Effect of dietary supplementation with cod liver shock and freezability of boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 431-435.
- Poulos, A., A. Darin-Bennet, and I.G. White. 1973. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol.* 46B: 541-549.
- Poulos, A., P. Sharp, D. Johnson, I. White, and A. Fellenberg. 1986. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem. J.* 240: 891-895.
- Poulos, S.P., M. Sisk, D.B. Hausman, M.J. Azain, and G.J. Hausman. 2001. Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.* 131: 2722-2731.
- Rahman, S.M., Y.M. Wang, H. Yotsumoto, J.Y. Cha, S.Y. Han, S. Inoue, and T. Yanagita. 2001. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 17(5): 385-390.
- Reese, D.E., R.C. Thaler, M.C. Brumm, A.J. Lewis, P.S. Miller, and G.W. Libal. 2000. *Swine Nutrition Guide, Nebraska and South Dakota*. Nebraska Cooperative Extension EC 95-273-C, ESS 38, Lincoln, Nebraska, USA. p. 26.
- Robinson, J.A.B., and M.M. Buhr. 2005. Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology* 63(2): 668-678.
- Roca, J., J.M. Vázquez, M.A. Gil, C. Cuello, I. Parrilla, and E.A. Martínez. 2006. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 41(Suppl. 2): 43-53.
- Rodriguez-Gil, J.E., and T. Rigau. 1995. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 39(2): 141-146.
- Rooke, J.A., C.C. Shao, and B.K. Speake. 2001. Effects of feeding tunc oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 121: 315-322.
- SAS Institute Inc. 2009. *SAS/STAT User's Guide, Second Edition*. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. pp. 3891-4092.
- Schmid, A., M. Collomb, R. Sieber, and G. Bee. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci.* 73: 29-41.
- Sorensen, A.M. 1979. *Animal Reproduction Principles and Practices*. McGraw-Hill Publishing Co., New York, USA. 416 p.

- Steel, R.G., J.H. Torrie, and D.A. Dickey. 1997. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 3rd. ed. WCB McGraw-Hill Co., New York, 666 p.
- Strzeżek, J., L. Fraser, m. Kuklińska, A. Dziekońska, and M. Lecewicz. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod. Biol.* 4(3): 271-287.
- Stubbs, C.D., and A.D. Smith. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta–Rev. Biomembranes* 779: 89-137.
- Sugano, M., A.Tsujita, M. Yamasali, M. Noguchi, and K. Yamada. 1998. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 33: 521-527.
- Swierstra, E.E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoon transit through the epididymis. *Anat. Rec.* 161(2): 171-186.
- Tardif, S., J.P. Laforest, N. Cornier, and J.L. Bailey. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52: 447-459.
- Tejada, H.I. 1992. Análisis de granos y cereales. In: *Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales*. Ed. Sistema de Educación Continúa en Producción Animal, A.C., México. pp. 27-33.
- Thibier, M., and B. Guerin. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62(1): 233-251.
- Waberski, D., A.M. Petrunkina, and E. Töpfer-Petersen. 2008. Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology* 70:1346-1351.
- Wathes, D., D. Abayasekara, and R. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77: 190-201.
- Webel, S.K., J.D. Spencer, and A.M. Gaines. 2007. The role of omega-3 and omega-6 fatty acids in swine reproduction. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 1). 401 (Abstr.).
- West, B.T., K.B. Welch, and A.T. Gałeccki. 2007. *Linear Mixed Models: a practical guide using statistical software*. Chapman and Hall/CRC, Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 339 p.
- Yamasaki, M., K. Kishihara, K. Mansho, Y. Ogino, M. Kasai, M. Sugano, H. Tachibana, and K. Yamada. 2000. Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(10): 2159-2164.

Cuadro 7. Composición de las dietas experimentales

Tratamiento	T1	T2		
Ingrediente, %				
Sorgo	82.083	82.083		
Pasta de soya	12.439	12.439		
Aceite crudo de soya	1.522	0.522		
ALC*	0.000	1.000		
L-Lisina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> **	0.330	0.330		
DL-Metionina	0.027	0.027		
L-Treonina	0.101	0.101		
Premezcla vitamínica†	0.200	0.200		
Premezcla micromineral‡	0.150	0.150		
Antioxidante	0.023	0.023		
Carbonato de calcio	1.066	1.066		
Ortofosfato	1.558	1.558		
Sal	0.500	0.500		
TOTAL	100.000	100.000		
Análisis calculado			NRC <sup>§</sup>	Reese <i>et al.</i> , 2000 <sup>b</sup>
Energía metabolizable, Mcal kg <sup>-1</sup>	3.265	3.265	3.265	3.30
Proteína cruda, %	13.00	13.00	13.00	---
Calcio, %	0.75	0.75	0.75	0.75
Fosforo disponible, %	0.40	0.40	0.35	0.40
Lisina, %	0.70	0.70	0.60	0.70
Metionina, %	0.24	0.24	0.16	0.18
Metionina+cistina, %	0.47	0.47	0.42	0.47
Treonina, %	0.57	0.57	0.50	0.57
Arginina, %	0.72	0.72	---	---
Histidina, %	0.33	0.33	0.19	0.22
Leucina, %	1.42	1.42	0.51	0.60
Isoleucina, %	0.55	0.55	0.35	0.41
Fenilalanina+tirosina, %	1.17	1.17	0.57	0.67
Valina, %	0.64	0.64	0.40	0.47
Análisis determinado				
Energía bruta, Mcal kg <sup>-1</sup>	3.925	3.935		
Proteína cruda, %	13.50	13.32		
Calcio, %	0.92	0.90		
Fosforo total, %	0.645	0.640		

\*Ácido linoleico conjugado (LutaCLA® 60 BASF Mexicana S.A. de C.V.), contiene: isómeros *cis*9, *trans*11, 30%; isómeros *trans*10, *cis*12, 30%; otros isómeros, ≤1%; ácido oleico, 22%; ácido palmítico, 6%; ácido esteárico, 4%; ácido linoleico, 2%; metanol, ≤100 ppm; metales pesados, ≤1 ppm.

\*\*BioLys, contiene: PC, 75%; fósforo disponible, 0.16%; lisina, 50.70%; treonina, 0.40%; triptófano, 0.14%; metionina, 0.20%; arginina, 0.60%; isoleucina, 0.40%; leucina, 0.70%; valina, 0.70%; cistina, 0.10%.

†Por cada kg de alimento proporcionó: vit. A, 15 000 UI; vit. D3, 2 500 UI; vit. E, 37.5 UI; vit. K, 2.5 mg, tiamina, 2.25 mg; riboflavina, 6.25 mg; niacina, 50 mg; piridoxina, 2.5 mg; cianocobalamina, 0.0375 mg; biotina, 0.13 mg; colina, 563 mg; ácido pantoténico, 20 mg; ácido fólico, 1.25 mg.

‡Aportó por cada kg de alimento: Fe, 150 mg; Zn, 150 mg; Mn, 150 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.9 mg; Cr, 0.2 mg.

§Recomendación de nutrimentos sugerida para verracos activos por el NRC, 1998.<sup>b</sup>Recomendación de nutrimentos sugerida para verracos activos por Reese *et al.*, 2000.

Cuadro 8. Perfil de ácidos grasos de los aceites usados en las dietas experimentales

Ácido graso (Esteres metílicos de ácidos grasos, %)	ACS	ALC
Palmítico (C16:0)	10.32	5.11
Palmitoleico (C16:1; n-7)	0.10	N.D.
Heptadecanoico (C17:0)	0.10	N.D.
Esteárico (C18:0)	4.16	4.26
Oleico (C18:1; n-9)	20.89	22.95
Cis-vaccénico (C18:1)	0.96	N.D.
Linoleico (C18:2; n-6)	54.94	0.46
$\alpha$ -linolénico (C18:3; n-3)	7.50	N.D.
ALC; <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 y <i>cis</i> 11, <i>trans</i> 9	N.D.	32.39
ALC; <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12	N.D.	30.00
Araquídico (C20:0)	0.32	N.D.
Eicosenoico (C20:1; n-9)	0.20	0.55
Eicosapentaenoico (EPA; C20:5; n-3)	0.34	0.66
Erúcico (C22:1; n-9)	N.D.	0.82
Lignocérico (C24:0)	0.11	0.14
Otros ácidos grasos	0.08	2.65
Ácidos grasos saturados	15.00	9.51
Ácidos grasos monoinsaturados	22.14	24.32
Ácidos grasos poliinsaturados	62.78	63.51

ACS= aceite crudo de soya; ALC= ácido linoleico conjugado; N.D. = no detectable.

Cuadro 9. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales

Ácido graso (Esteres metílicos de ácidos grasos, %)	T1	T2
Palmítico (C16:0)	12.79	9.92
Palmitoleico (C16:1; n-7)	0.42	0.26
Heptadecanoico (C17:0)	0.10	N.D.
Esteárico (C18:0)	3.19	2.58
Oleico (C18:1; n-9)	29.16	28.05
Cis-vaccénico (C18:1)	0.56	0.57
Linoleico (C18:2; n-6)	47.30	38.20
$\alpha$ -linolénico (C18:3; n-3)	3.91	2.64
ALC; <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 y <i>cis</i> 11, <i>trans</i> 9	N.D.	7.84
ALC; <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12	N.D.	7.82
Araquídico (C20:0)	0.26	0.44
Eicosenoico (C20:1; n-9)	0.31	0.32
Eicosapentaenoico (EPA; C20:5; n-3)	0.24	0.30
Erúcico (C22:1; n-9)	N.D.	0.23
Lignocérico (C24:0)	0.14	0.14
Otros ácidos grasos	1.48	0.68
Ácidos grasos saturados	16.63	13.08
Ácidos grasos monoinsaturados	30.44	29.43
Ácidos grasos poliinsaturados	51.45	56.80

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 1% de ALC; N.D.= no detectable.



Cuadro 10. Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ALC

Dieta	Semana	T1			T2			EEM <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>	Efecto principal	Significancia de		
		0*	4	8	12	4	8				12	D	S
Volumen del semen, mL	324.40	396.20	417.00	408.75	346.95	398.90	304.10	37.90	27.50	S*	NS	Q*	NS
Peso de la fracción gelatinosa, g	45.20	56.37	62.97	63.37	52.13	61.58	53.33	5.76	4.37	D×S*	NS	NS	Q*
Concentración espermática													
mL, 1×10 <sup>8</sup> células	2.19	2.15	1.99	2.42	2.16	2.22	2.47	0.27	0.20	S**	NS	L** Q*	NS
Total, 1×10 <sup>10</sup> células	6.71	6.85	6.89	8.49	7.95	8.60	8.21	0.86	0.56	S* D×S*	NS	L*	Q*
Viabilidad, %	91.65	94.92	96.81	96.71	94.86	97.40	97.08	0.24	0.27	S***	NS	L*** Q**	NS
Motilidad progresiva, %	89.50	89.57	89.06	89.57	89.68	90.18	89.93	0.67	0.54	NS	NS	NS	NS
Morfología anormal, %	9.10	7.19	5.09	4.94	7.34	5.11	4.76	1.13	0.87	S***	NS	L***	NS
pH seminal	7.34	7.30	7.23	7.14	7.37	7.32	7.29	0.02	0.01	D* S***	L*	L***	NS

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 1% de ALC.

\*Valores iniciales usados como covariables.

<sup>†</sup>Error estándar de la media entre dietas; <sup>‡</sup>Error estándar de la media entre semanas.

D= Dieta, S= semana, D×S= interacción entre la dieta y la semana.

Efectos: L=linear, Q= cuadrático, NS= no significativo; \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\*P≤0.001.

Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos de los espermatozoides de verracos alimentados con dietas adicionadas con ALC (g por cada 100 g de lípidos totales)

Dieta	Semana	T1			T2			EEM <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>	Efecto principal	Significancia de		
		0*	4	8	12	4	8				12	D	S
Ácidos grasos													
AGS totales	31.13	26.33	29.20	26.89	29.62	32.01	28.73	1.12	1.16	NS	NS	NS	NS
AGMI totales	18.15	15.86	14.98	13.82	14.96	16.89	16.35	1.27	1.45	NS	NS	NS	NS
AGPI totales	44.85	45.77	45.56	51.97	49.85	41.54	49.76	1.64	1.86	S*	NS	Q*	NS
AGNI	5.87	11.07	9.29	6.34	6.70	10.53	6.13	1.92	1.66	NS	NS	NS	NS
C18:2; n-6	3.81	4.04	4.08	2.56	2.92	4.75	3.49	0.48	0.59	NS	NS	NS	NS
ALC; <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	---	---	---	---
ALC; <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	---	---	---	---
C20:3; n-6	1.00	1.32	0.84	1.39	1.21	0.42	1.25	0.16	0.15	S*	NS	Q**	NS
C20:4; n-6	2.13	2.34	2.12	2.54	2.42	1.91	2.55	0.11	0.12	S**	NS	Q**	NS
C22:5; n-6	22.35	25.41	26.43	31.34	24.12	21.25	25.58	2.54	1.99	S*	NS	L*	NS
C22:6; n-3	15.35	14.61	13.70	15.60	17.18	10.91	14.09	1.11	1.08	S*	NS	Q*	NS
Total n-3	15.49	14.61	13.70	15.87	17.18	10.91	14.47	1.14	1.09	S*	NS	Q*	NS
Total n-6	29.36	33.38	34.07	38.25	30.51	28.41	33.07	2.06	1.59	S*	NS	L* Q*	NS
n-6 : n-3	2.20	2.66	2.76	2.66	1.94	2.58	2.41	0.28	0.22	S*	NS	Q*	NS
C22:5 n-6 : C22:6 n-3	1.67	1.99	2.20	2.30	1.48	1.89	1.87	0.24	0.17	S*	NS	L*	NS

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 1% de ALC.

\*Valores iniciales usados como covariables.

<sup>†</sup>Error estándar de la media entre dietas; <sup>‡</sup>Error estándar de la media entre semanas.

D= Dieta, S= semana, D×S= interacción entre la dieta y la semana, AGS= ácidos grasos saturados, AGMI= ácidos grasos monoinsaturados, AGPI= ácidos grasos poliinsaturados, AGNI= ácidos grasos no identificados, N.D.= no detectable.

Efectos: L=linear, Q= cuadrático, NS= no significativo; \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\*P≤0.001.

Cuadro 12. Características de la canal y testiculares de verracos alimentados con dietas adicionadas con ALC

Dieta	T1			T2			EEM <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>	Efecto principal	Significancia de			
	Semana 0*	4	8	12	4	8				12	D	S	D×S
GD, mm	12.30	10.82	10.57	11.37	13.08	13.23	14.08	0.80	0.58	D* S*	L*	L* Q*	NS
AML, cm <sup>2</sup>	41.49	41.84	41.59	43.33	43.42	44.50	45.25	2.00	1.40	S*	NS	L*	NS
ATDER, cm <sup>2</sup>	61.95	50.40	53.72	52.69	49.80	53.45	55.77	1.14	0.93	S***	NS	L*** Q*	NS
ATIZQ, cm <sup>2</sup>	60.97	49.54	52.50	52.09	51.66	54.67	54.29	1.53	1.19	S*	NS	L*Q*	NS

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 1% de ALC.

\*Valores iniciales usados como covariables.

<sup>†</sup>Error estándar de la media entre dietas; <sup>‡</sup>Error estándar de la media entre semanas.

D= Dieta, S= semana, D×S= interacción entre la dieta y la semana, GD= grasa dorsal, AML= área del músculo *Longissimus*, ATDER= área transversal del testículo derecho, ATIZQ= área transversal del testículo izquierdo.

Efectos: L=linear, Q= cuadrático, NS= no significativo; \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\*P≤0.001.



## CAPITULO II. ADICIÓN DE NUCLEÓTIDOS A DIETAS ESTÁNDAR PARA VERRACOS PARA MEJORAR LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES *IN VITRO*

### Resumen

El objetivo principal de este experimento fue determinar si la adición de nucleótidos a dietas para verracos mejora las características seminales y modifica el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. Diez verracos de línea terminal (Yorkshire×Landrace×Pietrain) fueron distribuidos a uno de dos tratamientos en un diseño completamente al azar; cada verraco fue una unidad experimental. Los tratamientos (T) fueron: T1) Dieta testigo (sin adición de nucleótidos; n=5), y T2) Dieta con 0.65% de nucleótidos (n=5). Los cerdos fueron eyaculados dos veces por semana. La cantidad y calidad del eyaculado fue evaluada mediante mediciones rutinarias. Muestras espermáticas de las semanas 0, 4, 8 y 12 fueron utilizadas para determinar cambios en el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. El volumen del semen y la concentración espermática total fueron afectados por la interacción entre la dieta y el tiempo, observándose una disminución en el volumen (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) y concentración espermática total (efecto lineal,  $P \leq 0.01$ ) en los cerdos que consumieron la dieta adicionada con nucleótidos. La adición de nucleótidos disminuyó (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) la concentración del ácido graso dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3; n=6) en el espermatozoide, además de observarse un incremento (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ) en la concentración de los ácidos grasos que no pudieron ser identificados (AGNI) por efecto de la interacción entre la dieta y el tiempo. La concentración de urea en plasma (UREA), grasa dorsal (GD) y área del músculo *Longissimus* (AML) no fueron afectados ( $P > 0.05$ ) por los nucleótidos; El área transversal del testículo derecho (ATDER; efecto lineal,  $P \leq 0.01$ ) e izquierdo (ATIZQ; efecto lineal,  $P \leq 0.01$ ) aumentó por efecto de la dieta, siendo mayor en los cerdos que consumieron la dieta testigo. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente experimento indican que la adición de nucleótidos a la dieta modifica el metabolismo de los lípidos a nivel testicular, además de afectar la eficiencia de la espermatogénesis, la cual se reflejó en una menor producción espermática.

**Palabras clave:** verracos, nucleótidos, calidad seminal, comportamiento reproductivo, espermatozoide.

## **Abstract**

The main aim of this experiment was to determine whether the nucleotides addition to boar diet could improve semen characteristics and modify the spermatozoa fatty acids profile. Ten lean-type (Yorkshire×Landrace×Pietrain) adult boars were randomly assigned to two treatments in a completely randomized design (each boar was a replicate). Treatments (T) were: T1) Control diet (without nucleotides addition; n=5), and T2) Diet with 0.65% of nucleotides (n=5). All boars were ejaculated twice per week. Classical measurements of sperm quantity and quality were performed. Semen samples from weeks 0 (at beginning of the experiment), 4, 8, and 12 were used to determine changes in sperm fatty acid profile. Semen volume and total concentration were affected by diet×time interaction; it was observed a decrease in volume (linear effect,  $P\leq 0.05$ ) and total sperm concentration (linear effect,  $P\leq 0.01$ ) in boars fed diets with nucleotides. Nucleotides intake decreases (linear effect,  $P\leq 0.05$ ) the dihomo- $\gamma$ -linolenic acid (20:3; n-6) concentration on spermatozoa. Moreover, it was observed an increase (quadratic effect,  $P\leq 0.05$ ) in concentration of fatty acids that could not be identified (AGNI) by the effect of diet×time interaction. Plasma urea concentration (UREA), backfat thickness (BFT) and *Longissimus* muscle area (LMA) were not affected by nucleotides intake; however, it was observed an increase in the transversal area on right (ATDER; linear effect,  $P\leq 0.01$ ) and left (ATIAZQ; linear effect,  $P\leq 0.01$ ) testis by effect of treatment, where transversal area was higher in boars fed the control diet. These results indicate that the nucleotides addition to the boar diet modify lipid metabolism at testicular level, and nucleotides also affect the spermatogenesis efficiency, reflected in lower sperm production.

**Keywords:** boars, nucleotides, reproductive performance, semen quality, spermatozoa.

## 2.1. Introducción

En la industria porcina, hacer un uso más eficiente del material genético de alta calidad y utilizar semen con elevados estándares de calidad para mejorar las variables productivas y reproductivas de las piaras, son algunos de los objetivos por los cuales se ha implementado la inseminación artificial. Sin embargo, son muchos los factores que afectan la producción y calidad del semen, y su impacto es poco conocido. Entre estos factores se ha visto que la nutrición juega un papel importante en las características seminales del eyaculado del cerdo. En algunos estudios se ha reportado que el nivel de proteína y energía de la dieta afectan la producción de semen (Louis *et al.*, 1994a,b). También la adición de ácidos grasos n-3 (Rooke *et al.*, 2001) o de selenio más vitamina E (Marín-Guzmán *et al.*, 1997) a la dieta mejoran la motilidad progresiva y disminuyen la proporción de anomalías espermáticas, mientras que la fortificación de la dieta con vitaminas hidrosolubles incrementa la motilidad espermática (Audet *et al.*, 2004). Sin embargo, no se han realizado estudios en los cuales se haya evaluado el efecto de la adición de nucleótidos a la dieta sobre las características seminales de cerdos.

Los nucleótidos son compuestos formados por una base nitrogenada unida a una pentosa y con al menos un grupo fosfato. Los nucleótidos participan en el proceso de división celular, crecimiento celular y modulación del sistema inmune; además de participar como precursores de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), también originan fuentes de energía (ATP y GTP), y son componentes de los cofactores FAD, NAD, S-adenosilmetionina y coenzima A, así como de la UDP-glucosa y CDP-diacilglicerol. Además, algunos nucleótidos, como el cAMP y el cGMP, actúan como segundos mensajeros (Carver y Walker, 1995; Carver, 1999; Nelson *et al.*, 2001). Aunque estos compuestos no se consideran esenciales, en algunas situaciones especiales pueden considerarse como semiesenciales o esenciales, particularmente cuando el organismo necesita una mayor cantidad de nucleótidos de la que puede sintetizar, como ocurre en periodos de rápido crecimiento, enfermedad o cuando hay un consumo limitado de nutrientes (Uauy *et al.*, 1994; Yu, 1998; Carver, 1999).

Se ha reportado que la adición de nucleótidos a la dieta, promueve el crecimiento y maduración intestinal (Uauy *et al.*, 1994; Yu, 1998), mantiene la integridad intestinal, reduce la incidencia de enfermedades entéricas en animales débiles o estresados por cambios ambientales o nutricionales (Gonçalves *et al.*, 2005), modifica el tipo y crecimiento de la

microflora intestinal (Núñez *et al.*, 1990; Uauy *et al.*, 1994) e incrementa la respuesta inmune celular y humoral (Carver, 1999; Maldonado *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2008); además, se ha visto que pueden modificar el metabolismo de los lípidos, ya que algunos reportes indican que la adición de nucleótidos a la dieta modifican el perfil de ácidos grasos de la membrana plasmática del eritrocito (DeLucchi *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1992). Adicionalmente se ha observado que el consumo de nucleótidos puede modificar la proporción de lipoproteínas en sangre (Sánchez-Pozo *et al.*, 1994; Siahianidou *et al.*, 2004). Sin embargo, todos estos efectos sólo se han reportado en individuos lactantes. Por lo anterior, los objetivos de este experimento fueron: determinar si la adición de nucleótidos a la dieta para verracos, al mejorar la salud del intestino, podría modificar el metabolismo de los nutrientes, específicamente de los lípidos, y con esto cambiar el perfil de ácidos grasos del espermatozoide y mejorar las características del semen de cerdos.

## **2.2. Materiales y métodos**

Esta investigación se realizó en la granja experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, localizada en el municipio de Texcoco, Estado de México. Geográficamente se localiza a 98° 48' 27" de longitud oeste y a 19° 48' 23" de latitud norte, a una altura de 2241 msnm (García, 1988). El estudio se realizó durante los meses de febrero a mayo de 2009. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el periodo experimental dentro de las instalaciones fueron: 30.6, 5.5, y 19.2 °C, respectivamente.

### **Animales y tratamientos**

Diez verracos de línea terminal (Yorkshire×Landrace×Pietrain) con peso promedio de 245±18.4 kg y una edad de aproximadamente 28 meses, fueron distribuidos en un diseño completamente al azar de dos tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento, durante 12 semanas. Los verracos se alojaron individualmente en corrales de 2.0×2.4 m (4.80 m<sup>2</sup>), con piso de concreto, equipados con bebederos de chupón. Los animales tuvieron libre acceso al agua. La alimentación fue restringida, ofreciendo 2.8 kg d<sup>-1</sup> en el piso del corral. Durante todo el experimento, la limpieza de los corrales y animales e inspección de salud se realizó todos los días.



Después de un periodo de manejo pre-experimental de cuatro semanas, los verracos fueron asignados a uno de los dos tratamientos experimentales. Durante el periodo pre-experimental, los verracos fueron alimentados con la dieta testigo; después de este periodo fueron alimentados con las dietas experimentales hasta finalizar el experimento.

Los tratamientos evaluados fueron dos niveles de nucleótidos (0 y 0.65%) derivados de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas estándar para verracos (Cuadro 13). Las dietas se formularon con base en sorgo-pasta de soya, y fueron adicionadas con aminoácidos sintéticos (L-lisina·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DL-metionina y L-treonina). La adición de lisina, treonina y metionina se realizó hasta alcanzar los niveles recomendados por Reese *et al.* (2000). Además, las dietas fueron formuladas para cubrir el requerimiento de proteína cruda (13%) y energía metabolizable (3.265 Mcal kg<sup>-1</sup>) recomendado por el NRC (1998).

### **Colección de semen**

Previo al inicio del experimento (cuatro semanas) todos los verracos fueron eyaculados una vez por semana, y dos veces por semana durante el periodo experimental (12 semanas). El semen fue colectado usando la técnica de mano enguantada (Hancock y Hovell, 1959); los verracos fueron eyaculados durante todo el periodo experimental por la misma persona. Después de la eyaculación de cada uno de los verracos se registró el volumen total de la fracción rica en espermatozoides y el peso de la fracción gelatinosa. La fracción rica en espermatozoides fue separada de la fracción gelatinosa utilizando bolsas de colección para semen para cerdos con filtro (US Bag™ System, Cat: 11123/0100, Minitube México.). El semen fue mantenido a 37 °C en un baño María durante su evaluación en el laboratorio de la granja experimental.

### **Evaluación del semen**

La concentración espermática por mililitro se determinó utilizando una cámara de Neubauer. El conteo de espermatozoides se realizó utilizando semen diluido en una solución de citrato de sodio al 3%, con formol (3 mL de formol en 1000 mL de agua bidestilada) en una relación 1:200, contándose los espermatozoides presentes en 5 de los 25 cuadros de la cámara de Neubauer (Ax *et al.*, 2000). La concentración espermática total se obtuvo multiplicando la concentración por mililitro por el volumen total de la fracción rica en espermatozoides.

La evaluación de la motilidad espermática se realizó colocando una gota de semen en un portaobjetos atemperado a 37 °C, el cual fue observado en un microscopio óptico a 400x. La motilidad espermática total fue determinada como el porcentaje de espermatozoides que presentaron algún signo de motilidad o movimiento en dos áreas de medición al contar 100 células por área (Rodríguez-Gil y Rigau, 1995).

El pH del semen fue medido en una muestra de semen de 20 mL, inmediatamente después de la eyacuación de cada verraco, utilizando un potenciómetro portátil (Orion, Modelo: 265, Orion Research, Inc. Alemania).

### **Viabilidad y morfología espermática**

La viabilidad espermática y morfología espermática fue evaluada por medio de frotis de semen teñidos con eosina-nigrosina (Bamba, 1988; Tardif *et al.*, 1999). Antes de realizar el frotis en los portaobjetos, la mezcla de semen con la tinción fue incubada por 2 min a 37 °C, posteriormente se dejó secar por 30 minutos. Los frotis teñidos fueron evaluados en un microscopio óptico a 400x, contando 200 espermatozoides por frotis. Los espermatozoides viables fueron definidos como aquellos que no se tiñeron. La morfología espermática fue evaluada cuantificando la proporción de espermatozoides con anomalías de cabeza (suelta, macrocabezas, microcabezas, piriformes), cola (enrolladas, dobladas, quebradas, dobles colas), pieza media, y presencia de gotas citoplasmáticas (proximal, distal, parcialmente desprendida; Sorensen, 1979).

### **Características de la canal y testiculares**

El grosor de la grasa dorsal (GD) y área del músculo *Longissimus* (AML) fue medido a nivel de la décima costilla en cada uno de los verracos en las semanas 0, 4, 8 y 12 del periodo experimental; adicionalmente se midió el área transversal de los testículos derecho (ATDER) e izquierdo (ATIZQ), utilizando un ultrasonido de tiempo real Sonovet 600 (Medison, Inc., Cypress, California, USA).

### **Concentración de urea en plasma sanguíneo**

Para determinar la concentración de urea en plasma sanguíneo (UREA), se tomaron muestras de sangre en la semana 0, 4, 8 y 12; las muestras sanguíneas fueron tomadas por medio de punción de la vena cava anterior utilizando tubos vacutainer con heparina (BD

Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, 07417, USA). Las muestras de sangre se colocaron en hielo hasta centrifugarse a 1800 g a 4 °C por 20 minutos para separar el paquete celular del plasma sanguíneo; una vez separados, el plasma se transfirió a tubos de polipropileno y fueron guardados a -20 °C hasta realizar las determinaciones de urea.

### **Análisis de laboratorio**

Muestras de células espermáticas de las semanas 0, 4, 8 y 12 de cada uno de los verracos fueron tomadas para realizar el análisis de ácidos grasos. El semen fue centrifugado a 1500 g durante 20 min a 4 °C, para separar las células espermáticas del plasma seminal. Una vez separadas las células espermáticas fueron re-suspendidas a 50 mL con una solución que contenía BTS™ (Beltsville Thawing Solution; Minutube, Querétaro, México), posteriormente fueron re-centrifugadas. Las células espermáticas lavadas fueron guardadas a -20 °C hasta realizar el análisis de ácidos grasos.

La determinación de lípidos totales de las células espermáticas y dietas experimentales se realizó siguiendo el método 923.07 de la AOAC (2000). La saponificación de los lípidos totales se realizó con sosa metanólica al 2%, utilizando ácido miristoleico (Cat. no. M3525, Sigma-Aldrich Co., USA) como estándar interno para el análisis cromatográfico. La transesterificación de los lípidos de las células espermáticas y las dietas a ésteres metílicos se realizó de acuerdo al método 969.33 de la AOAC (2000), usando triflourito de boro-metanol (Cat. no. B1252, Sigma-Aldrich Co., USA). La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases en un equipo Varian 3400 CX (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) con auto-muestreador 8400 y detector de ionización de flama; la columna utilizada fue una DB23 (30 m × 0.25 mm d.i.; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), utilizando N<sub>2</sub> como gas acarreador a un flujo de 30 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas de operación de la columna, inyector y detector fueron de 230, 150 y 300 °C, respectivamente. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron por sus tiempos de retención relativos a una mezcla de estándares (FAME mix C4–C24 no. 18919-1 AMP, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA; *cis*-4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid, Cat. no.18566-10MG (Fluka), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). La concentración de los ácidos grasos de las muestras se calculó utilizando el área de cada pico con relación al área conocida del estándar. Estos análisis se realizaron en

el laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en la Ciudad de México, México.

Las dietas experimentales fueron analizadas para determinar la concentración de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990); energía bruta en una bomba calorimétrica adiabática (Oxygen Bomb Calorimeter, Parr Instruments Co. Illinois, USA), siguiendo la metodología propuesta por Tejada (1992); calcio por espectrofotometría de absorción atómica (Espectrofotómetro Varian SpectrAA 10 plus, Varian, Australia), y fósforo total por espectrofotometría de absorción de rayos UV (Espectrofotómetro Varian Cary 1E UV-vis, Varian, Australia), siguiendo las metodologías de Fick *et al.* (1979). La concentración de urea en plasma fue determinada por espectrofotometría de absorción de rayos UV (Espectrofotómetro Varian Cary 1E UV-vis, Varian, Australia), siguiendo la metodología propuesta por Chaney y Marbach (1962). Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal, Campus Montecillo, del Colegio de Posgraduados.

#### **Análisis estadístico**

Las anormalidades espermáticas individuales se sumaron para obtener un sólo valor de células espermáticas con anormalidades por eyaculado. Todas las variables fueron sometidas a análisis de normalidad antes de realizar el análisis de varianza. El perfil de ácidos grasos de las células espermáticas, características seminales, características de la canal y testiculares fueron analizadas con el procedimiento MIXED de SAS (West *et al.*, 2007; SAS, 2009). Los valores iniciales del perfil de ácidos grasos de las células espermáticas, de las características seminales, de la canal y testiculares fueron usados como covariables. Para determinar el efecto del tiempo de consumo de la dieta, y de la interacción entre la dieta y el tiempo, se utilizaron polinomios ortogonales lineares y cuadráticos (Steel *et al.*, 1997).

### **2.3. Resultados**

#### **Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales**

El análisis del perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales (Cuadro 14) mostró que las dietas experimentales proporcionaron cantidades similares de los diferentes ácidos grasos.

### **Características seminales**

En el cuadro 15 se muestran las características seminales. La producción (volumen) de semen fue afectada por la interacción entre la dieta y el tiempo (D×S), observándose una disminución (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) en el volumen del semen en los cerdos que consumieron la dieta adicionada con nucleótidos y un incremento en ésta variable en los cerdos que consumieron la dieta testigo (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ). No obstante lo anterior, la concentración espermática por mL sólo disminuyó por efecto del tiempo (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ) en los dos tratamientos; sin embargo, la concentración espermática total fue afectada por la interacción D×S, observándose una menor concentración espermática total (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) en los cerdos que consumieron la dieta adicionada con nucleótidos. Por otro lado, mientras que la viabilidad (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ; efecto cuadrático,  $P \leq 0.01$ ) y motilidad progresiva (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) disminuyeron, el pH seminal aumentó (efecto cuadrático,  $P \leq 0.01$ ) durante el periodo experimental.

### **Perfil de ácidos grasos en células espermáticas**

El perfil de ácidos grasos de los espermatozoides se presenta en el cuadro 16. De la concentración total de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, sólo los ácidos grasos saturados totales disminuyeron (efecto lineal,  $P \leq 0.01$ ; efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ) durante el periodo experimental; sin embargo, se observó un incremento (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ) en la concentración de los ácidos grasos que no pudieron ser identificados (AGNI) por efecto de la interacción entre la dieta y el tiempo. El análisis individual de los ácidos grasos, mostró que el consumo de los nucleótidos disminuyó (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) el ácido graso dihomo- $\gamma$ -linolénico (C20:3 n-6). Por otro lado, sólo la relación entre el ácido docosapentaenoico y docosahexaenoico presentó una reducción (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ) durante el periodo experimental.

### **Características de la canal y testiculares**

En el cuadro 17, se muestra el efecto del consumo de los nucleótidos sobre las características de la canal y testiculares. Aunque las variables de las características de la canal no fueron afectadas por el consumo de los nucleótidos ( $P > 0.05$ ), la GD (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ) y el AML (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ), presentaron un incremento a través del tiempo. En cuanto al área transversal testicular el tratamiento y el tiempo incrementaron ésta variable en

los dos testículos; por un lado, los nucleótidos indujeron un menor crecimiento testicular (efecto lineal,  $P \leq 0.05$ ); mientras que el tiempo aumentó el ATDER (efecto cuadrático,  $P \leq 0.05$ ) y ATIZQ (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ; efecto cuadrático,  $P \leq 0.01$ ).

### **Concentración de urea plasmática**

La concentración de urea en plasma (cuadro 17), no fue afectada por el consumo de la dieta adicionada con nucleótidos ( $P > 0.05$ ); pero mostró una reducción durante el periodo experimental (efecto lineal,  $P \leq 0.001$ ; efecto cuadrático,  $P \leq 0.01$ ).

## **2.4. Discusión**

La disminución en el volumen del semen y concentración espermática total en los cerdos que consumieron la dieta con nucleótidos indica que estos compuestos tienen efectos detrimentales en la producción espermática y, al parecer, la adición de los nucleótidos a la dieta puede afectar la espermatogénesis en los cerdos. Por otro lado, aunque el resto de las características seminales no fueron afectadas por el consumo de nucleótidos, la disminución en la concentración espermática por mL, viabilidad y motilidad progresiva, e incremento en la morfología anormal y pH seminal durante el periodo experimental, puede ser explicado por el incremento en la temperatura ambiental que se registró al pasar del invierno a la primavera, ya que se ha visto que en los meses más cálidos del año la concentración espermática y la producción de semen disminuyen (Kennedy y Wilkins, 1984; Trudeau y Sanford, 1986; Kunavongkrit y Prateep, 1995; Ciereszko *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000), mientras que las anomalías espermáticas incrementan (McNitt y First, 1970; Larsson y Einarsson, 1984; Huang *et al.*, 2000).

Debido a la duración de la espermatogénesis (34 a 39 d; Swierstra, 1968) y el tiempo que dura el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo (9 a 12 d; Swierstra, 1968; França *et al.*, 2005), se determinó que doce semanas eran suficientes para observar algún cambio en el perfil de ácidos grasos del espermatozoide por efecto del consumo de los nucleótidos. El incremento en la concentración de los ácidos grasos que no pudieron ser identificados por cromatografía y la disminución del ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (C20:3, n-6) por efecto del consumo de los nucleótidos, indican que los nucleótidos tienen la capacidad de modificar el metabolismo de los lípidos a nivel testicular. Esta capacidad de los nucleótidos de

alterar el metabolismo de los lípidos ya ha sido reportado en eritrocitos, en los cuales se ha observado que afectan la conversión de los ácidos grasos esenciales, principalmente del ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico, a ácidos grasos de cadena larga derivados de su metabolismo, como es el ácido araquidónico (C20:4; n-6) y ácido adrenico (C22:4; n-6), los cuales se ha observado que incrementan su concentración en los fosfolípidos totales de la membrana plasmática, mientras que se disminuye la concentración del ácido docosahexaenoico (22:6; n-3; DeLucchi *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1992). Aunque en el presente experimento no se observó una reducción en la concentración de los ácidos grasos docosahexaenoico o docosapentaenoico, la disminución del ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico y el incremento de los AGNI probablemente puedan afectar la fluidez de la membrana plasmática y por lo tanto la capacidad fecundante del espermatozoide.

En cuanto a las características de la canal y testiculares, la grasa dorsal y el área del músculo *Longissimus* no fueron afectados por el consumo de nucleótidos; lo anterior concuerda con los resultados reportados por Hunziker y Spring (2002) en cerdos recién destetados, Saldaña *et al.* (2009) en cerdos en crecimiento y Rivera *et al.* (2010) en cerdos en finalización, los cuales no encontraron efecto en estas dos variables de la canal al sustituir parte de la proteína de la dieta por nucleótidos o suplementar a la dieta con estos compuestos. Por otro lado, en los cerdos que consumieron las dietas adicionadas con nucleótidos se observó una menor área testicular, lo cual coincide con una menor producción espermática e indica que los nucleótidos tienen la capacidad de alterar las funciones testiculares (espermatogénesis).

La concentración de urea plasmática observada en los dos tratamientos indica que los nucleótidos no afectan el metabolismo ni la eficiencia de utilización de la proteína dietaria en los verracos.

## **2.5. Conclusiones**

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente experimento indican que la adición de 0.65% de nucleótidos a la dieta para verracos altera la espermatogénesis, lo cual se reflejó en una menor producción espermática; además, modifica el metabolismo de los lípidos a nivel testicular, pues cambia el perfil de ácidos grasos de la célula espermática. Estos efectos pueden impactar en la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide y por lo tanto, en la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304-2008 del Colegio de Postgraduados. Agradecemos a la Dra. Adelfa del Carmen García Contreras por la donación de los verracos para la realización de esta investigación. También queremos hacer extensivo nuestro agradecimiento a la M.C. Silvia Carrillo y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán, por su apoyo en el análisis del perfil de ácidos grasos.



## 2.6. Literatura citada

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Arlington (VA): Association of Official Analytical Chemists. 1298 p.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists. 556 p.
- Audet, I., J.P. Laforest, G.P. Martineau, and J.J. Matte. 2004. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamins status, and semen quality in boars. *J. Anim. Sci.* 82: 626-633.
- Ax, R.L., M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2000. Semen Evaluation. *In*: Hafez, E.S.E., and B. Hafez (eds.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Wiley-Blackwell. Baltimore, USA. pp. 365-375.
- Bamba, K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29(6): 1245-1251.
- Carver, J.D., and W.A. Walker, 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 6: 58-72.
- Carver, J.D. 1999. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal system. *Acta Paediatrica* 88(9; suppl. 430): 83-88.
- Chaney, A.L., and E.P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8(2): 130-132.
- Ciereszko, A., J.S. Ottobre, and J. Glogowski. 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci.* 64: 89-96.
- DeLucchi, C., M.L. Pita, M.J. Faus, J.A. Molina, R. Uauy, and A. Gil. 1987. Effects of dietary nucleotides on fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 6: 568-574.
- Fick, K.R., L.R. McDowell, R.H. Miles, N.S. Wilkins, J.D. Funk, and J.H. Conrad. 1979. *Methods of Mineral Analysis of Plant and Animal Tissues*. 2nd ed. Animal Science Department, University of Florida, Gainesville, FL. USA. 763 p.
- França, L.R., G.F. Avelar, and F.F.L. Almeida. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63: 300-318.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 27.
- Gonçalves, X.E., F. Rutz, y P. Rossi. 2005. Uso de una fuente rica en nucleótidos, proteínas e inositol (NuPro<sup>MR</sup>) en dietas para cerdos. *Proc. Alltech's 21th Annual Symposium*. Lexington, Kentucky, USA. pp. 49-61.
- Hancock, J.L., and G.J.R. Hovell. 1959. The collection of boar semen. *Vet. Rec.* 71: 664-665.

- Huang, S.Y., Y.H. Kuo, Y.P. Lee, H.L. Tsou, E.C. Lin, C.C. Ju, and W.C. Lee. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 231-240.
- Hunziker, S.V., and P. Spring. 2002. Effect of protein source derived from yeast extract on performance and health of weanling piglets. *J. Anim. Sci.* 80 (suppl. 1): 220 (Abstr.).
- Jiménez, J., J. Boza Jr., M.D. Suárez, and A. Gil. 1992. Changes in fatty acid profile of red blood cell membrane mediated by dietary nucleotides in weanling rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 14: 293-299.
- Kennedy, B. W., and J. N. Wilkins. 1984. Boar, breed and environment factors influence semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 833-843.
- Kunavongkrit, A., and P. Prateep. 1995. Influence of ambient temperature on reproductive efficiency in pigs: 1. Boar semen quality. *Pig J.* 35: 43-47.
- Larsson, K., and S. Einarsson. 1984. Seminal changes in boars after heat stress. *Acta Vet. Scand.* 25: 57-66.
- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.S. Miller, R.J. Kittok, and W.W. Stroup. 1994a. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2038-2050.
- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.M. Ermer, P.S. Miller, R.J. Kittok, and W.W. Stroup. 1994b. The effect of energy and protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2051-2060.
- Maldonado, J., J. Navarro, E. Narbona, and A. Gil. 2001. The influence of dietary nucleotides on humoral and cell immunity in the neonate and lactating infant. *Early Hum. Dev.* 65(suppl. 2): S69-S74.
- Marin-Guzman, J., D.C. Mahan, Y.K. Chung, J.L. Pate, and W.F. Pope. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75: 2994-3003.
- McNitt, J.I., and N.L. First. 1970. Effects of 72-hour heat stress on semen quality in boars. *Int. J. Biometeorol.* 14: 373-380.
- Navarro, J., J. Maldonado, E. Narbona, A. Ruiz-Bravo, J.L. García, J.A. Molina, and A. Gil. 2008. Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants. *BioFactors* 10(1): 67-76.
- Nelson, D. L., M.M. Cox, y C.M. Cuchillo. 2001b. Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas. In: *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 3ra. ed., Omega S.A., Barcelona, España. pp. 688-735.
- NRC (National Research Council). 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington, D.C., USA. p. 123.

- Nuñez, M.C., M.V. Ayudarte, D. Morales, M.D. Suárez, and A. Gil. 1990. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. *J. Parent. Ent. Nutr.* 14(6): 598-604.
- Reese, D.E., R.C. Thaler, M.C. Brumm, A.J. Lewis, P.S. Miller, and G.W. Libal. 2000. *Swine Nutrition Guide, Nebraska and South Dakota*. Nebraska Cooperative Extension EC 95-273-C, ESS 38, Lincoln, Nebraska, USA. p. 26.
- Rivera, A., J.L. Figueroa, E. Saldaña, V. Zamora, M.T. Sánchez, y J.L. Cordero. 2010. Finalización de cerdos con baja proteína y manano-oligosacáridos o nucleótidos. *Arch. Zootec.* 59(227): 357-368.
- Rodríguez-Gil, J.E., and T. Rigau. 1995. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 39(2): 141-146.
- Rooke, J.A., C.C. Shao, and B.K. Speake. 2001. Effects of feeding tunc oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 121: 315-322.
- Saldaña, E., J. Figueroa, V. Zamora, M. Sánchez, y J. Cordero. 2009. Respuesta de porcinos en crecimiento alimentados con dietas a base de sorgo-pasta de soya con bajo nivel de proteína y suplementadas con manano-oligosacáridos o nucleótidos. *Rev. Fac. Agron. (UCV)* 35(3): 85-93.
- Sánchez-Pozo, A., J. Morillas, L. Moltó, R. Robles, and A. Gil. 1994. Dietary nucleotides influence lipoprotein metabolism in newborn infants. *Pediatr. Res.* 35(1): 112-116.
- SAS Institute Inc. 2009. *SAS/STAT User's Guide, Second Edition*. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. pp. 3891-4092.
- Sihanidou, T., H. Mandyla, I. Papassotiriou, and D. Anagnostakis. 2004. Serum lipids in preterm infants fed a formula supplemented with nucleotides. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 38: 56-60.
- Sorensen, A.M. 1979. *Animal Reproduction Principles and Practices*. McGraw-Hill Publishing Co., New York, USA. 416 p.
- Steel, R.G., J.H. Torrie, and D.A. Dickey. 1997. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 3rd. ed. WCB McGraw-Hill Co., New York, 666 p.
- Swierstra, E.E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoon transit through the epididymis. *Anat. Rec.* 161(2): 171-186.
- Tardif, S., J.P. Laforest, N. Cornier, and J.L. Bailey. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52: 447-459.
- Tejada, H.I. 1992. Análisis de granos y cereales. In: *Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales*. Ed. Sistema de Educación Continúa en Producción Animal, A.C., México. pp. 27-33.
- Trudeau, V., and L.M. Sanford. 1986. Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace boar. *J. Anim. Sci.* 63: 1211-1219.

- Uauy, R., R. Quan, and A. Gil. 1994. Role of nucleotides in intestinal development and repair: implications for infant nutrition. *J. Nutr.* 124: 1436S-1441S.
- West, B.T., K.B. Welch, and A.T. Gałecki. 2007. *Linear Mixed Models: a practical guide using statistical software*. Chapman and Hall/CRC, Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 339 p.
- Yu, V.Y. 1998. The role of dietary nucleotides in neonatal and infant nutrition. *Singapore Med. J.* 39(4): 145-150

Cuadro 13. Composición de las dietas experimentales

Tratamiento	T1	T2		
Ingrediente, %				
Sorgo	82.083	80.728		
Pasta de soya	12.439	12.724		
Nucleótidos*	0.000	0.650		
Aceite crudo de soya	1.522	1.953		
L-Lisina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> **	0.330	0.320		
DL-Metionina	0.027	0.028		
L-Treonina	0.101	0.100		
Premezcla vitamínica <sup>†</sup>	0.200	0.200		
Premezcla micromineral <sup>‡</sup>	0.150	0.150		
Antioxidante	0.023	0.023		
Carbonato de calcio	1.066	1.064		
Ortofosfato	1.558	1.559		
Sal	0.500	0.500		
TOTAL	100.000	100.000		
Análisis calculado			NRC <sup>§</sup>	Reese <i>et al.</i> , 2000 <sup>b</sup>
Energía metabolizable, Mcal kg <sup>-1</sup>	3.265	3.265	3.265	3.30
Proteína cruda, %	13.00	13.00	13.00	13.00
Calcio, %	0.75	0.75	0.75	0.75
Fosforo disponible, %	0.40	0.40	0.35	0.40
Lisina, %	0.70	0.70	0.60	0.70
Metionina, %	0.24	0.24	0.16	0.18
Metionina+cistina, %	0.47	0.47	0.42	0.47
Treonina, %	0.57	0.57	0.50	0.57
Arginina, %	0.72	0.72	---	---
Histidina, %	0.33	0.33	0.19	0.22
Leucina, %	1.42	1.42	0.51	0.60
Isoleucina, %	0.55	0.55	0.35	0.41
Fenilalanina+tirosina, %	1.17	1.17	0.57	0.67
Valina, %	0.64	0.64	0.40	0.47
Análisis determinado				
Energía bruta, Mcal kg <sup>-1</sup>	3.92	3.93		
Proteína cruda, %	13.70	13.95		
Calcio, %	0.82	0.81		
Fosforo total, %	0.63	0.64		

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 0.65% de nucleótidos

\*Nucleótidos contiene: PC, 50%.

\*\* BioLys®, contiene: PC, 75%; fósforo disponible, 0.16%; lisina, 50.70%; treonina, 0.40%; triptófano, 0.14%; metionina, 0.20%; arginina, 0.60%; isoleucina, 0.40%; leucina, 0.70%; valina, 0.70; cistina, 0.10%.

<sup>†</sup>Por cada kg de alimento proporcionó: vit. A, 15 000 UI; vit. D3, 2 500 UI; vit. E, 37.5 UI; vit. K, 2.5 mg, tiamina, 2.25 mg; riboflavina, 6.25 mg; niacina, 50 mg; piridoxina, 2.5 mg; cianocobalamina, 0.0375 mg; biotina, 0.13 mg; colina, 563 mg; ácido pantoténico, 20 mg; ácido fólico, 1.25 mg.

<sup>‡</sup>Aportó por cada kg de alimento: Fe, 150 mg; Zn, 150 mg; Mn, 150 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.9 mg; Cr, 0.2 mg.

<sup>§</sup>Recomendación de nutrimentos sugerida para verracos activos por el NRC, 1998.<sup>b</sup>Recomendación de nutrimentos sugerida para verracos activos por Reese *et al.*, 2000.

Cuadro 14. Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales

Ácido graso (Esteres metílicos de ácidos grasos, %)	T1	T2
Palmítico (C16:0)	12.79	12.73
Palmitoleico (C16:1; n-7)	0.42	0.40
Heptadecanoico (C17:0)	0.11	0.10
Esteárico (C18:0)	3.19	3.10
Oleico (C18:1; n-9)	29.16	28.78
Cis-vaccénico (C18:1)	0.58	0.58
Linoleico (C18:2; n-6)	47.30	47.97
$\alpha$ -linolénico (C18:3; n-3)	3.91	3.80
Araquídico (C20:0)	0.26	0.25
Eicosenoico (C20:1; n-9)	0.31	0.30
Eicosapentaenoico (EPA; C20:5; n-3)	0.24	0.24
Lignocérico (C24:0)	0.14	0.14
Otros ácidos grasos	1.48	1.47
Ácidos grasos saturados	16.49	16.42
Ácidos grasos monoinsaturados	30.53	30.06
Ácidos grasos poliinsaturados	51.45	52.01

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 0.65% de nucleótidos

Cuadro 15. Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con nucleótidos

Dieta	Semana	T1			T2			EEM <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>	Efecto principal	Significancia de		
		0*	4	8	12	4	8				12	D	S
Volumen del semen, mL	284.40	288.82	301.50	300.12	287.48	252.18	246.48	17.71	13.38	D×S*	NS	NS	L* Q*
Peso de la fracción gelatinosa, g	66.04	58.67	41.80	37.22	56.43	42.08	37.33	4.02	2.91	S***	NS	L***	Q**
Concentración espermática													
mL, 1×10 <sup>8</sup> células	2.92	2.77	2.45	2.73	2.93	2.72	2.79	0.24	0.17	S*	NS	Q*	NS
Total, 1×10 <sup>10</sup> células	7.94	7.76	7.14	7.88	8.21	6.49	6.39	0.28	0.24	S** D×S*	NS	L* Q**	L**
Viabilidad, %	96.25	95.50	96.99	95.04	98.26	98.06	96.01	0.51	0.43	S**	NS	L* Q**	L*
Motilidad progresiva, %	91.00	90.48	89.58	89.48	91.26	90.39	88.02	0.96	0.82	S*	NS	L*	NS
Morfología anormal, %	6.81	10.75	11.20	11.56	7.77	9.23	9.89	1.97	1.30	NS	NS	NS	NS
pH seminal	7.22	7.29	7.37	7.32	7.31	7.42	7.36	0.02	0.01	S***	NS	Q***	NS

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 0.65% de nucleótidos

\*Valores iniciales usados como covariables.

<sup>†</sup>Error estándar de la media entre dietas; <sup>‡</sup>Error estándar de la media entre semanas.

D= Dieta, S= semana, D×S= interacción entre la dieta y la semana.

Efectos: L=linear, Q= cuadrático, NS= no significativo; \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\*P≤0.001.

Cuadro 16. Perfil de ácidos grasos de los espermatozoides de verracos alimentados con dietas adicionadas nucleótidos (g por cada 100 g de lípidos totales)

Dieta	T1			T2			EEM <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>	Efecto principal	Significancia de			
	0*	4	8	12	4	8				12	D	S	D×S
Ácidos grasos													
AGS totales	27.40	29.28	30.01	26.34	27.49	29.60	21.52	0.88	1.08	S**	NS	L** Q*	NS
AGMI totales	13.03	16.19	15.34	19.78	14.76	16.89	17.78	1.43	1.74	NS	NS	NS	NS
AGPI totales	55.06	46.77	42.29	42.85	41.92	45.11	37.93	2.43	2.92	NS	NS	NS	NS
AGNI	4.49	8.00	12.60	11.27	15.59	18.15	22.52	2.14	2.60	D×S*	NS	NS	Q*
C18:2; n-6	2.66	4.20	3.99	5.22	5.29	6.28	4.23	0.92	1.00	NS	NS	NS	NS
C20:3; n-6	1.32	0.97	1.16	0.83	0.83	0.90	0.52	0.11	0.13	D* S*	L*	Q*	NS
C20:4; n-6	2.67	2.56	2.45	2.15	1.91	2.27	1.77	0.16	0.19	NS	NS	NS	NS
C22:5; n-6	29.96	22.60	19.51	19.32	18.47	19.15	14.06	2.04	2.18	NS	NS	NS	NS
C22:6; n-3	17.29	16.63	16.28	15.50	12.61	15.40	11.90	1.47	1.61	NS	NS	NS	NS
Total n-3	18.10	17.15	16.07	15.80	14.04	15.61	13.30	1.55	1.64	NS	NS	NS	NS
Total n-6	36.97	30.68	27.28	27.82	26.64	28.43	20.53	1.64	1.80	NS	NS	NS	NS
n-6 : n-3	2.23	1.86	1.82	1.84	2.07	1.97	1.62	0.17	0.16	NS	NS	NS	NS
C22:5; n-6 : C22:6; n-3	1.90	1.44	1.29	1.28	1.50	1.28	1.14	0.16	0.13	S*	NS	L*	NS

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 0.65% de nucleótidos

\*Valores iniciales usados como covariables.

<sup>†</sup>Error estándar de la media entre dietas; <sup>‡</sup>Error estándar de la media entre semanas.

D= Dieta, S= semana, D×S= interacción entre la dieta y la semana, AGS= ácidos grasos saturados, AGMI= ácidos grasos monoinsaturados, AGPI= ácidos grasos poliinsaturados, AGNI= ácidos grasos no identificados.

Efectos: L=linear, Q= cuadrático, NS= no significativo; \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\*P≤0.001.



Cuadro 17. Características de la canal y testiculares de verracos alimentados con dietas adicionadas con nucleótidos

Dieta	Semana	T1			T2			EEM <sup>†</sup>	EEM <sup>‡</sup>	Efecto principal	Significancia de			
		0*	4	8	12	4	8				12	D	S	D×S
UREA, mg dL <sup>-1</sup>	17.40	24.65	18.46	19.18	22.73	18.14	19.47	0.89	0.81	S***	NS	L***	Q**	NS
GD, mm	12.20	14.27	16.37	17.32	13.52	14.97	15.47	0.89	0.64	S***	NS	L***		NS
ÁML, cm <sup>2</sup>	45.53	51.08	52.83	53.31	50.21	52.12	51.88	1.17	0.94	S*	NS	L*		NS
ATDER, cm <sup>2</sup>	52.19	54.43	58.83	58.40	52.22	55.37	52.91	0.95	0.84	D* S*	L*	Q*		NS
ATIZQ, cm <sup>2</sup>	54.61	51.95	57.58	57.80	49.89	54.42	52.37	0.99	0.93	D* S***	L*	L***	Q**	NS

T1= dieta testigo; T2= dieta adicionada con 0.65% de nucleótidos

\*Valores iniciales usados como covariables.

<sup>†</sup>Error estándar de la media entre dietas; <sup>‡</sup>Error estándar de la media entre semanas.

D= dieta, S= semana, D×S= interacción entre la dieta y la semana. GD= grasa dorsal, AML= área del músculo *Longissimus*, ATDER= área transversal del testículo derecho, ATIZQ= área transversal del testículo izquierdo.

Efectos: L=linear, Q= cuadrático, NS= no significativo; \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\*P≤0.001.



### **CAPITULO III. SEXUAL BEHAVIOR OF CASTRATED BOARS TREATED WITH PROSTAGLANDIN F<sub>2α</sub><sup>1</sup>**

#### **Abstract**

The objectives were to test the hypothesis that prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) temporarily restores the sexual behavior of castrated boars, and to evaluate effects on serum hormone concentrations. At 35 d after castration, nine lean-type adult boars were randomly assigned to three treatments in a 3×3 latin square (with three replicates). Treatments were three doses of PGF<sub>2α</sub> (0, 10, and 20 mg) and three periods of treatment, with 5 d between each period. Testosterone (T) concentrations were non-detectable at the start of the experiment. Serum concentrations of estradiol (E<sub>2</sub>), LH, prolactin (PRL) and cortisol were unaffected (P>0.05) by PGF<sub>2α</sub> treatment. The interval from treatment to ejaculation in boars treated with 10 mg (758 s) or 20 mg (660 s) PGF<sub>2α</sub> did not differ but were different (P<0.05) from control boars (>1 800 s). Ejaculation duration and false mounts differed (P<0.05) between control boars and boars treated with 10 or 20 mg PGF<sub>2α</sub>. In conclusion, PGF<sub>2α</sub> treatment did not change serum concentrations of T, E<sub>2</sub>, LH, PRL, or cortisol, but restored sexual behavior. This restoration may have been due to an effect of PGF<sub>2α</sub> directly in specific areas of the brain, or indirectly via release of other hormones that stimulate areas in the brain that affected sexual behavior.

**Keywords:** Castrated boars, Hormones, Libido, PGF<sub>2α</sub>.

---

<sup>1</sup> Este manuscrito ha sido publicado en *Theriogenology* 2010, 74(1): 100-104.

\*El formato de este manuscrito es diferente a las normas editoriales de *Theriogenology*, para armonizar con el estilo de la tesis.

### 3.1. Introduction

Although libido and circulating testosterone concentrations are positively correlated (Ren *et al.*, 2009), Louis *et al.* (1994a,b) reported that libido was more strongly correlated with plasma concentration of estrogen rather than testosterone. The latter authors noted that low circulating concentrations of estradiol increased the time required to start ejaculation (Louis *et al.*, 1994a) and diminished the duration of ejaculation (Louis *et al.*, 1994b). However, decreased sexual behavior due to castration of adult boars can be restored by both testosterone and estradiol replacement therapy (Joshi and Raeside, 1973; Levis and Ford, 1989). In addition to effects of steroids, there is considerable evidence indicating an association between libido in boars and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ; Kozink *et al.*, 2002; Estienne and Harper, 2004; Estienne *et al.*, 2007). Furthermore, exogenous  $PGF_{2\alpha}$  enhanced sexual behavior in male pigs. In that regard, treatment with  $PGF_{2\alpha}$  reduced the time to train inexperienced young (Szurop *et al.*, 1985; Estienne *et al.*, 2001) and sexually active mature boars (Estienne and Harper, 2000) to mount an artificial sow for semen collection, and decreased the number of false mounts and the period from treatment to the start of the ejaculation (Szurop *et al.*, 1985; Estienne and Harper, 2000; Estienne *et al.*, 2004). Further,  $PGF_{2\alpha}$  treatment restored sexual behavior in older boars exhibiting low libido (Szurop *et al.*, 1985).

The mechanism through which  $PGF_{2\alpha}$  affects libido has not been elucidated, but it has been proposed that the  $PGF_{2\alpha}$  stimulates testicular steroid release (Kozink *et al.*, 2002). However, experimental results are inconsistent. Fonda *et al.* (1981) did not find increased blood concentrations of either testosterone or estrogen in young boars given 20 mg of  $PGF_{2\alpha}$ . In contrast, Estienne *et al.* (2004) using adult boars with GnRH-induced suppression of gonadal steroid production, reported that  $PGF_{2\alpha}$  increased both testosterone and estradiol concentrations so that they were similar to those of control boars. In addition to steroid release, Fonda *et al.* (1981) reported that  $PGF_{2\alpha}$  treatment increased prolactin and cortisol concentrations in blood by 452 and 262%, respectively, in the first 30 min after treatment, although a role for these hormones in the control of libido has not been determined.

The objectives of the present experiment were to evaluate the effects of PGF<sub>2α</sub> treatment on serum concentrations of selected hormones, and to further examine its role in the sexual behavior of castrated boars.

### **3.2. Material and methods**

#### **Boars and treatments**

This experiment was conducted at the Experimental Farm of Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, during July 2008. Nine lean-type terminal-line boars, trained at approximately 9 mo of age to mount an artificial sow for semen collection, were used. Boars were individually housed in pens (4.8 m<sup>2</sup>) with concrete floor and were floor-fed 2.8 kg d<sup>-1</sup> of a sorghum-soybean meal-based diet, formulated to meet or exceed NRC (1998) recommendations. There was *ad libitum* access to water via nipple drinkers.

All boars were castrated on the same day, 35 d before the start of the experiment, using approved procedures (CIOMS, 1986; Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001). Every second day (starting 20 d after castration), boars were moved individually to a semen collection pen (9 m<sup>2</sup>) containing an artificial sow to determine if they still had sex drive (Figure 47). Four days after all boars refused to mount the artificial sow, it was again confirmed that none boar displayed libido. Nine days after all boars lost their drive to mount the artificial sow (26 d after castration), the experiment started. At the beginning of the experiment, the boars were approximately 32 mo old and weighed 245±18.4 kg. Boars were randomly assigned in a 3×3 latin square design (with three replicates), with three treatments and three 5-d periods between each experimental period. Treatments were three PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse; Pharmacia and Upjohn, México, DF, México) doses (0, 10 and 20 mg) given i.m. to evaluate its effects on serum hormone concentrations and sexual behavior characteristics in castrated adult boars. For control treatment (0 mg), boars received 2 mL of saline solution.

#### **Blood collection**

Blood samples were collected from the anterior vena cava, on the first day of each treatment period, 2 h prior to treatment with PGF<sub>2α</sub> or saline solution, and again immediately after ejaculation or 30 min after treatment application when boars did not mount the artificial

sow. Blood samples were placed on ice until centrifuged at  $1800 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 min, and the serum was transferred to polypropylene tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed.

### **Hormone assays**

Serum concentrations of testosterone, estradiol and cortisol were determined by immunoradiometric assay (IRMA), using a commercial kit (Coat-A-Count; Siemens Healthcare Diagnostics S. de R.L. de C.V., México, D.F., México) for each hormone. For testosterone assay sensitivity was  $4 \text{ ng dL}^{-1}$  and the intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) were 8.3 and 6.4%, respectively. For the estradiol assay, sensitivity was  $10 \text{ pg dL}^{-1}$  and intra and inter-assay CVs were 7.0 and 8.1, respectively. For the cortisol assay, sensitivity was  $0.2 \text{ } \mu\text{g dL}^{-1}$  and the intra and inter-assay CVs were 4.8 and 5.2%, respectively. The LH concentration was quantified by double antibody radioimmunoassay (Kraeling *et al.*, 1982); the sensitivity of the assay was  $0.7 \text{ ng mL}^{-1}$  with intra and inter-assay CVs of 0.5 and 11.6%, respectively. Prolactin concentration was measured by enzyme immunoassay (EIA) using a commercial kit (Immunometrics, London, UK) with  $20 \text{ mUI L}^{-1}$  sensitivity and intra and-inter assay CVs of 5.2 and 2.0%, respectively.

### **Evaluation of sexual behavior**

Sexual behavior was assessed by the reaction time, the duration of ejaculation, and the number of false mounts (Louis *et al.*, 1994a,b; Audet *et al.*, 2004; Estienne *et al.*, 2004). The reaction time was defined as the interval from treatment application immediately ( $<60 \text{ s}$ ) prior to entering the collection area until the start of ejaculation. The duration of ejaculation was defined as the time from the beginning to the end of ejaculation. False mounts were defined as mounting of the artificial sow, but dismounting prior the start of the ejaculation, i.e., mounting without ejaculation.

### **Statistical analysis**

Hormone concentrations and sexual behavior characteristics were analyzed using PROC GLM of SAS (2002). The model included treatment as the main effect, with hormone concentrations prior to the treatment application used as covariates. The PROC LSMEANS was used for the means treatment comparison, and multiple comparison tests of means in couples with ADJUST=TUKEY were performed. In addition, correlation analyses were

performed using PROC CORR, to determine correlations between concentration of hormones prior to and after treatment application, and characteristics of sexual behavior.

### **3.3. Results**

#### **Hormone concentrations**

Serum testosterone concentrations were non-detectable in all boars before and after treatment. Serum concentrations of estradiol, LH, prolactin and cortisol were not affected by treatment ( $P>0.05$ ; Table 18).

#### **Sexual behavior**

The reaction time ( $P<0.01$ ), duration of ejaculation ( $P<0.01$ ), and false mounts ( $P<0.06$ ) were different between control boars and boars treated with  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , but were similar ( $P>0.05$ ) between boars treated with 10 or 20 mg of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Table 19). No control boar exhibited any interest in mounting the artificial sow.

Intense scratching of the face and neck with the hind legs, frequent urination, intense contraction of anus (with or without defecation), were observed before erection and ejaculation in boars treated with 20 mg  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . One boar exhibited change of color (reddish) and more intense itching in the first 5 min after receiving 20 mg  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

### **3.4. Discussion**

In this study, sexual behavior of boars, specifically the desire to mount an artificial sow, ceased by 26 d after castration. Further, castration suppressed serum testosterone to non-detectable concentration but did not suppress completely circulating estradiol concentration (from 276.6 to 4.8  $\text{pg mL}^{-1}$ ), presumably reflecting an adrenal component. It is known that steroid replacement can maintain libido after castration of boars (Joshi and Raeside, 1973; Levis and Ford, 1989), but the degree of estradiol suppression in the present study was sufficient to eliminate all desire to mount the artificial sow in all boars by 26 d after castration. The estradiol suppression and lack of interest in mounting an artificial sow are consistent with Louis *et al.* (1994a), who reported that boars with blood estradiol concentrations of 52  $\text{pg mL}^{-1}$  refused to mount an artificial sow.

Although treatment with  $\text{PGF}_{2\alpha}$  did not affect the concentration of T and E2, invariably it was associated with a successful mount and ejaculation, which usually was the first attempt, although occasional false mounts were observed, with success achieved at the second mount. Despite a wealth of data to support the linkage of exogenous  $\text{PGF}_{2\alpha}$  and boar libido, the mechanism involved remains undetermined. That  $\text{PGF}_{2\alpha}$  has been associated with maintenance of circulating steroid concentrations in boars receiving GnRH implants, and that estrogen or testosterone replacement therapy can restore and maintain libido in castrates, an effect involving the production of gonadal steroids might be anticipated. However, based on the present data, improved libido was achieved without an effect on gonadal steroid production in castrated boars.

Similarly, in intact boars, Fonda *et al.* (1981) found that  $\text{PGF}_{2\alpha}$  increased blood concentrations of cortisol and prolactin, but did not significantly affect LH or testosterone release. In contrast, we observed no effect of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  on prolactin or cortisol release. Further, we are aware of no evidence that prolactin and cortisol can impact libido in boars. Interestingly, in humans, an acute depression of prolactin release increased the sex drive, whereas increasing circulating prolactin did not change sexual behavior (Krüger *et al.*, 2003). Similarly, although it has been reported that high concentrations of cortisol during copulation enhanced LH in boars, we are aware of no reports linking cortisol and libido. Indeed, exogenous application of corticosteroids did not alter sexual behavior in rats (Renata-Marquez *et al.*, 1998). We inferred that cortisol and prolactin do not affect the sex drive and, apparently, prolactin and cortisol increase in response to  $\text{PGF}_{2\alpha}$  only in intact boars (Fonda *et al.*, 1981).

Based on the present study, we inferred that the effects of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  on sexual behavior are independent of changes in endogenous hormone release, and therefore may be due to a direct action of the  $\text{PGF}_{2\alpha}$  at the level of the hypothalamus, preoptic area, or hippocampus (Burne *et al.*, 2002; Walton *et al.*, 2002). Alternatively, an indirect action by stimulation of afferent nerves in smooth muscle organs (Peeters *et al.*, 1983) or the paraventricular and supraoptic nuclei, could then facilitate the release of other hormones, e.g., oxytocin (Knigge *et al.*, 2003). In that regard, oxytocin exerted effects on sexual behavior areas of the brain, resulting in



penile erection and ejaculation (Argiolas, 1992; Gimpl and Fahrenholz, 2001; Argiolas and Melis, 2004).

In conclusion, the  $\text{PGF}_{2\alpha}$  treatment of castrated boars does not significantly change serum concentrations of testosterone, estradiol, LH, prolactin or cortisol, but it restored sexual behavior. The mechanism involved in restoration of libido is not resolved, although an action at the level of the brain is plausible.

### **Acknowledgements**

Hormonal analyses were supported by Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). Our gratitude is extended to the laboratory staff of Laboratorio de Hormonas Proteicas of INNSZ.

### 3.5. References

- Argiolas, A. 1992. Oxytocin stimulation of penile erection. Pharmacology, site, and mechanism of action. *Ann. NY Acad. Sci.* 652: 194-203.
- Argiolas, A., and M.R. Melis. 2004. The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol. Behav.* 83(2): 309-317.
- Audet, I., J.P. Laforest, G.P. Martineau, and J.J. Matte. 2004. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J. Anim. Sci.* 82: 626-633.
- Burne, T.H.J., P.J.E. Murfitt, and C.L. Gilbert. 2002. *c-fos* mRNA expression associated with PGF<sub>2α</sub>-induced nest-building behaviour in female pigs. *Mol. Brain Res.* 104(1): 31-37.
- CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences). 1986. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Bankowski Z, Howard-Jones (Eds.), CIOMS. 28 p.
- Estienne, M.J., and A.F. Harper. 2000. PGF<sub>2α</sub> facilitates the training of sexually active boars for semen collection. *Theriogenology* 54: 1087-1092.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, and C.E. Babb. 2001. Lutalyse enhances libido in boars being trained to mount an artificial sow for semen collection. *J. Anim. Sci.* 79(suppl. 2): 21 (Abstr.).
- Estienne, M.J., and A.F. Harper. 2004. Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with PGF<sub>2α</sub>. *J. Anim. Sci.* 82: 1494-1498.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, J.W. Knight, C.R. Barb, and G.B. Rampacek. 2004. Sexual behavior after treatment with prostaglandin-F<sub>2α</sub> in boars with suppressed concentrations of gonadal steroids. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 89: 53-57.
- Estienne, M.J., A.F. Harper, W.E. Beal, and R.J. Crawford. 2007. Effects of prostaglandins and prostaglandin synthesis inhibitors on sexual behavior in boars. *Reprod. Biol.* 72(2): 163-175.
- Fonda, E.S., J.R. Diehl, C.R. Barb, T.E. Kiser, R.R. Kraeling, and G.B. Rampacek. 1981. Serum luteinizing hormone, testosterone, prolactin and cortisol concentrations after PGF<sub>2α</sub> in the boar. *Prostaglandins* 21(6): 933-943.
- Gimpl, G., and F. Fahrenholz. 2001. The oxytocin receptors system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81: 629-683.
- Joshi, H.S., and J.I. Raeside. 1973. Synergistic effects of testosterone and oestrogens on accessory sex glands and sexual behaviour of the boar. *J. Reprod. Fert.* 33: 411-423.
- Knigge, U., A. Kjaer, U. Kristoffersen, K. Madsen, C. Toftegaard, H. Jørgensen, and J. Warberg. 2003. Histamine and prostaglandin interaction in regulation of oxytocin and vasopressin secretion. *J. Neuroendocrinol.* 15: 940-945.

- Kozink, D.M., M.J. Estienne, A.F. Harper, and J.W. Knight. 2002. The effect of luteal phase on the training of sexually inexperienced boars for semen collection. *Theriogenology* 58: 1039-1045.
- Kraeling, R.R., G.B. Rampacek, N.M. Cox, and T.E. Kiser. 1982. Prolactin and luteinizing hormone secretion after bromocryptine (CB-154) treatment in lactating sows and ovariectomized gilts. *J. Anim. Sci.* 54: 1212-1220.
- Krüger, T.H.C., P. Haake, J. Haverkamp, M. Krämer, M.S. Exton, B. Saller, N. Leygraf, U. Hartmann, and M. Schedlowski. 2003. Effects of acute prolactin manipulation on sexual drive and function in males. *J. Endocrinol.* 179: 357-365.
- Levis, D.G., and J.J. Ford. 1989. The influence of androgenic and estrogenic hormones on sexual behavior in castrated adult male pigs. *Horm. Behav.* 23: 393-411.
- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.S. Miller, R.J. Kittok, and W.W. Stroup. 1994a. The effect of protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72:2038-2050.
- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.M. Ermer, P.S. Miller, R.J. Kittok, and W.W. Stroup. 1994b. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2051-2060.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, México.
- NRC (National Research Council). 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washington, D.C., USA. p. 123.
- Peeters, G., J.J. Legros, C. Piron-Bossuyt, R. Reynaert, R. Vander Driessche, and E. Vannieuwenhuysse. 1983. Release of neurophysin I and oxytocin by stimulation of the genital organs in bulls. *J. Endocrinol.* 99: 161-171.
- Ren, D., Y. Xing, M. Lin, Y. Wu, K. Li, W. Li, S. Yang, T. Guo, J. Ren, J. Ma, L. Lan, and L. Huang. 2009. Evaluation of boar gonad development, spermatogenesis with regard to semen characteristics, libido and serum testosterone levels based on Large White Duroc × Chinese Erhualian crossbred boars. *Reprod. Dom. Anim.* 44(6): 913-919.
- Renata-Marquez, S., H. Bonilla-Jaime, and J. Velazquez-Moctezuma. 1998. Lack of effect of corticosterone administration on male sexual behavior of rats. *Physiol. Behav.* 63(3): 367-370.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS/STAT<sup>®</sup> 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. pp. 1818-1906
- Szurop, I., A. Nagy, and W. Jöchle. 1985. Stimulation of libido in pubertal and mature boars with prostaglandin F<sub>2α</sub> analogs: clinical observations. *Reprod. Dom. Anim.* 20(2): 8 (Abstr.).

Walton, S.L., T.H.J. Burne, and C.L. Gilbert. 2002. Prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced nest- building behaviour is associated with increased hypothalamic *c-fos* and *c-jun* mRNA expression. J. Neuroendocrinol. 14(9): 711-723.

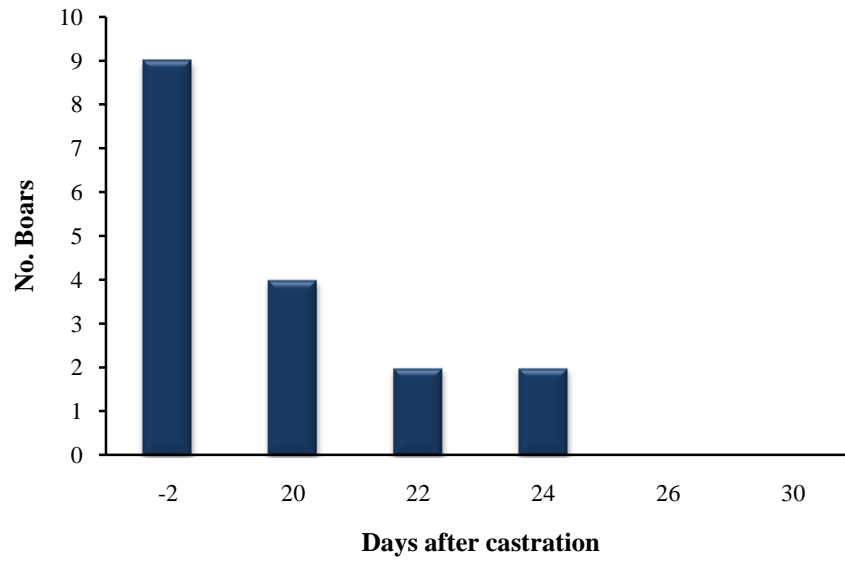


Figure 47. Boars mounting from 20 to 30 d after castration.

Table 18. Serum hormone concentrations in castrated boars, before and after treatment with PGF<sub>2α</sub><sup>1</sup>

Item	Two hours prior to treatment					After ejaculation or 30 min after treatment				
	T, ng mL <sup>-1</sup>	E2, pg mL <sup>-1</sup>	LH, ng mL <sup>-1</sup>	PRL, mUI mL <sup>-1</sup>	Cortisol, μg mL <sup>-1</sup>	T, ng mL <sup>-1</sup>	E2, pg mL <sup>-1</sup>	LH, ng mL <sup>-1</sup>	PRL, mUI mL <sup>-1</sup>	Cortisol, μg mL <sup>-1</sup>
Control (n=9)	0.0	4.9	13.4	72.9	5.1	0.0	2.6	13.7	75.2	8.3
10 mg-PGF <sub>2α</sub> (n=9)	0.0	5.3	14.1	123.7	4.6	0.0	2.8	15.7	98.2	8.4
20 mg-PGF <sub>2α</sub> (n=9)	0.0	4.3	10.3	71.5	4.9	0.0	2.3	14.4	95.9	10.6
SEM	0.0	1.0	1.0	41.5	0.7	0.0	0.6	1.3	51.4	1.4

<sup>1</sup>T: testosterone; E2: estradiol; LH: luteinizing hormone; PRL: prolactin; SEM: standard error of the mean.

Table 19. Sexual behavior characteristics of castrated boars treated with PGF<sub>2α</sub>

Item	Control	10 mg-PGF <sub>2α</sub>	20 mg-PGF <sub>2α</sub>	SEM
Reaction time, s	>>1 800 <sup>a*</sup>	758.4 <sup>b</sup>	660.4 <sup>b</sup>	109.5
Ejaculation duration, s	0.0 <sup>b</sup>	323.7 <sup>a</sup>	298.4 <sup>a</sup>	45.1
No. false mounts	0.0 <sup>b</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.1

<sup>a,b</sup> Within a row, values without a common superscripts differ (P < 0.05).

\*More than 1800 s means the boar did not mount the artificial sow.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

### 1. Conclusiones

Los estudios del efecto del consumo de dietas adicionadas con ALC y nucleóticos sobre las características seminales y perfil de ácidos grasos del espermatozoide son los primeros en realizarse en animales reproductivamente activos.

En términos generales se concluye que la adición de ácido linoleico conjugado a la dieta no mejora la calidad o producción de semen, ni modifica el perfil de ácidos grasos del espermatozoide, pero incrementa la grasa dorsal de los verracos. Estos resultados indican que el ALC no altera el metabolismo de los lípidos a nivel testicular, pero sí lo afecta a nivel del tejido graso.

La adición de nucleótidos a la dieta disminuye la producción espermática y modifica el perfil de ácidos grasos del espermatozoide. Estos resultados indican que los nucleótidos alteran la espermatogénesis y modifican el metabolismo de los lípidos a nivel testicular. Este último efecto podría tener un impacto importante en la fluidez de la membrana plasmática y por consiguiente en la capacidad fertilizante del espermatozoide.

En el caso del comportamiento sexual de los verracos castrados, la aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no cambió la concentración de testosterona, estradiol, LH, prolactina o cortisol, pero restableció temporalmente el deseo sexual. Aunque el mecanismo de cómo la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  restablece el deseo sexual no pudo ser dilucidado, se ha planteado que este restablecimiento tal vez sea debido a que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  actúa directamente en áreas específicas del cerebro o indirectamente a través de la liberación de otras hormonas, diferentes a las analizadas, que estimulan áreas del cerebro que controlan el deseo sexual.



## 2. Recomendaciones

Aunque no se encontró incorporación del ácido linoleico conjugado en los lípidos de la membrana del espermatozoide o efecto sobre las variables de calidad seminal *in vitro* y producción de semen, es necesario determinar el efecto de su consumo sobre la capacidad fecundante del espermatozoide. Además, se debe determinar el efecto del consumo del ALC a largo plazo sobre las variables de calidad y producción seminal.

La alteración del perfil de ácidos grasos por el consumo de los nucleótidos, sugiere que es necesario determinar los ácidos grasos que no pudieron ser identificados en el análisis del perfil de ácidos grasos de la membrana de la célula espermática, con la finalidad de conocer su posible impacto sobre la fluidez y capacidad fecundante del espermatozoide.

También es necesario plantear experimentos que nos ayuden a determinar el mecanismo de estimulación temporal de la libido en cerdos castrados tratados con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que los resultados obtenidos en esta investigación indican que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pudiera afectar directamente áreas del cerebro que controlan el deseo sexual o por mecanismos indirectos que desencadenan una cascada de liberación hormonal que estimule el deseo sexual en el verraco castrado.

Es necesario hacer uso de las tecnologías disponibles más recientes para determinar con mayor precisión las variables de producción y calidad espermática, tales como los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), los cuales miden simultáneamente y con un mínimo margen de error todas las variables de calidad seminal.

## **ANEXOS**

Permisos de reproducción de figuras e imágenes.

9 septiembre 24, 2010

Dr. Vicente Zamora-Zamora  
Colegio de Postgraduados  
Recursos Geneticos y Productividad-Ganaderia  
Km. 36.5 Carretera Mexico-Texcoco  
Texcoco, Estado de Mexico  
56230

Re: Figures 1 and 5 from Ip et al., **“Induction of Apoptosis by Conjugated Linoleic Acid in Cultured Mammary Tumor Cells and Premalignant Lesions of the Rat Mammary Gland”** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. July 2000 9:689-696

Dear Dr. Zamora-Zamora:

Thank you for your recent correspondence requesting permission to reprint the above-referenced figures from *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.

On behalf of the American Association for Cancer Research, Inc., as copyright owner of the journal in which these works were originally published, I am pleased to extend to you the requested permission contingent upon your obtaining the concurrence of the authors (if you are not one). When reproducing these data, please include an appropriate citation acknowledging our journal as the original source of the material. The citation should be formatted as follows: Reprinted (or adapted if you are reproducing a modified version of an image) with permission from followed by the complete article citation including figure or table number(s) if you are reproducing an image or images.

Thank you for your interest in our publication.

Sincerely,

Margaret Foti, Ph.D., M.D. (h.c.)  
Chief Executive Officer

MF:nds

## AMERICAN SOCIETY FOR NUTRITION LICENSE

License Agreement between Vicente Zamora-Zamora ("You") and American Society for Nutrition ("American Society for Nutrition") provided by Copyright Clearance Center ("CCC").

<b>License number</b>	2500951266194
<b>License date</b>	Sep 02, 2010
<b>Volume number</b>	136
<b>Issue number</b>	2
<b>Licensed content publisher</b>	American Society for Nutrition
<b>Licensed content publication</b>	The Journal of Nutrition
<b>Licensed content title</b>	Trans-10, cis-12- and cis-9, trans-11-Conjugated Linoleic Acid Isomers Selectively Modify HDL-Apolipoprotein Composition in Apolipoprotein E Knockout Mice
<b>Licensed content author</b>	Jose M. Arbones-Mainar, Maria A. Navarro, Sergio Acin et al.
<b>Licensed content date</b>	Feb 1, 2006
<b>Type of Use</b>	Thesis/Dissertation
<b>Requestor type</b>	Student
<b>Portion</b>	Figures/table/illustration
<b>Number of figures/tables/illustrations</b>	1
<b>List of figures/table/illustration</b>	Figure 3.
<b>Order reference number</b>	
<b>Title of your thesis/dissertation</b>	Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos, y comportamiento sexual de verracos castrados tratados con PGF2 alfa
<b>Expected completion date</b>	Sep 2010
<b>Estimated size (number of pages)</b>	180

## ELSEVIER LICENSE

License Agreement between Vicente Zamora-Zamora ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC").

<b>Supplier</b>	Elsevier Limited The Boulevard,Langford Lane Kidlington,Oxford,OX5 1GB,UK
<b>Registered Company Number</b>	1982084
<b>Customer name</b>	Vicente Zamora-Zamora
<b>Customer address</b>	Prol. Centenario 3, Montecillo, Texcoco Texcoco, other 56230
<b>License number</b>	2503311389012
<b>License date</b>	Sep 06, 2010
<b>Licensed content publisher</b>	Elsevier
<b>Licensed content publication</b>	Atherosclerosis
<b>Licensed content title</b>	Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid
<b>Licensed content author</b>	Sinead Toomey, Brendan Harhen, Helen M. Roche, Desmond Fitzgerald, Orina Belton
<b>Licensed content date</b>	July 2006
<b>Licensed content volume number</b>	187
<b>Licensed content issue number</b>	1
<b>Number of pages</b>	10
<b>Type of Use</b>	reuse in a thesis/dissertation
<b>Requestor type</b>	Not specified
<b>Intended publisher of new work</b>	other
<b>Portion</b>	figures/tables/illustrations
<b>Number of figures/tables/illustrations</b>	1
<b>Format</b>	both print and electronic
<b>Are you the author of this Elsevier article?</b>	No
<b>Will you be translating?</b>	Yes
<b>Number of languages</b>	1
<b>Languages</b>	Spanish
<b>Order reference number</b>	
<b>Title of your thesis/dissertation</b>	Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos, y comportamiento sexual de verracos castrados tratados con PGF2 alfa
<b>Expected completion date</b>	Sep 2010
<b>Estimated size (number of pages)</b>	180
<b>Elsevier VAT number</b>	GB 494 6272 12

## AMERICAN SOCIETY FOR NUTRITION LICENSE

This is a License Agreement between Vicente Zamora-Zamora ("You") and American Society for Nutrition ("American Society for Nutrition") provided by Copyright Clearance Center ("CCC").

<b>License number</b>	2503770151291
<b>License date</b>	Sep 07, 2010
<b>Volume number</b>	133
<b>Issue number</b>	10
<b>Licensed content publisher</b>	American Society for Nutrition
<b>Licensed content publication</b>	The Journal of Nutrition
<b>Licensed content title</b>	Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity
<b>Licensed content author</b>	J. Mark Brown, Michael K. McIntosh
<b>Licensed content date</b>	Oct 1, 2003
<b>Type of Use</b>	Thesis/Dissertation
<b>Requestor type</b>	Student
<b>Portion</b>	Figures/table/illustration
<b>Number of figures/tables/illustrations</b>	1
<b>List of figures/table/illustration</b>	Figure 2
<b>Order reference number</b>	
<b>Title of your thesis/dissertation</b>	Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos, y comportamiento sexual de verracos castrados tratados con PGF2 alfa
<b>Expected completion date</b>	Sep 2010
<b>Estimated size (number of pages)</b>	180

## DIABETES : A JOURNAL OF THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION

**Order detail ID:** 44443412  
**ISBN/ISSN:** 1939-327X  
**Publication year:** 2000  
**Publisher:** American Diabetes Association  
**Rightsholder:** American Diabetes Association  
**Author/Editor:** Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H.J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto, and O. Ezaki  
**Permission type:** Republish into a book, journal, newsletter...  
**Requested use:** Dissertation  
**Republication title:** Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos, y comportamiento sexual de verracos castrados tratados con PGF2 alfa  
**Republishing organization:** Colegio de Postgraduados  
**Organization status:** Non-profit 501(c)(3)  
**Republication date:** 09/30/2010  
**Circulation/Distribution:** 20  
**Type of content:** Photograph  
**Description of requested content:** Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice  
**Page range(s):** 1534 -1542  
**Translating to:** Spanish  
**Requested content's publication date:** 09/01/2000  
**Your reference:** Thesis of Vicente Zamora Zamora, Literature review

## **AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY LICENSE**

This is a License Agreement between Vicente Zamora-Zamora ("You") and American Society for Biochemistry and Molecular Biology ("American Society for Biochemistry and Molecular Biology") provided by Copyright Clearance Center ("CCC").

### **Journal of Lipid Research**

**Title:** Trans-10,cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling  
**Author:** Soonkyu Chung, Jonathan Mark Brown, Maria Boysen Sandberg, Michael McIntosh  
**Publication:** Journal of Lipid Research  
**Date:** May 1, 2005

Copyright © 2005, by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

### **Non-profit/Non-commercial Use**

For **Non-profit/Non-commercial** uses: You are free to copy, distribute, transmit and to adapt the work under the following conditions:

**Attribution.** You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

**Non-commercial.** You may not use the work for commercial purposes; including original authors reusing content by a commercial publisher.



## WOLTERS KLUWER HEALTH LICENSE

This is a License Agreement between Vicente Zamora-Zamora ("You") and Wolters Kluwer Health ("Wolters Kluwer Health") provided by Copyright Clearance Center ("CCC").

<b>License number</b>	2503780943759
<b>License date</b>	Sep 07, 2010
<b>Licensed content publisher</b>	Wolters Kluwer Health
<b>Licensed content publication</b>	Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care
<b>Licensed content title</b>	Nucleotides as immunomodulators in clinical nutrition
<b>Licensed content author</b>	George Grimble and Olwyn Westwood
<b>Licensed content date</b>	Jan 1, 2001
<b>Volume number</b>	4
<b>Issue number</b>	1
<b>Type of Use</b>	Dissertation/Thesis
<b>Requestor type</b>	Individual
<b>Title of your thesis/dissertation</b>	Características seminales de verracos alimentados con dietas adicionadas con ácido linoleico conjugado o nucleótidos, y comportamiento sexual de verracos castrados tratados con PGF2 alfa
<b>Expected completion date</b>	Sep 2010
<b>Estimated size (number of pages)</b>	180
<b>Billing Type</b>	Invoice
<b>Billing Address</b>	Prol. Centenario 3, Montecillo, Texcoco, other 56230, Mexico