



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Detección y expresión de los receptores retinoicos RAR

en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna*

***pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Tatiana Rubí ROJAS CHAMOCHUMBI

ASESOR

Mg. Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rojas T. Detección y expresión de los receptores retinoicos RAR en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Tatiana Rubí Rojas Chamochumbi
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47961558
URL de ORCID	
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Alberto Gustavo Manchego Sayán
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15619652
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8199-0418
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	15725076
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mercy Gisela Ramírez Velásquez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10713781
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luis Manuel Barrios Arpi
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43485699
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.2. Sanidad Agropecuaria

Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Virología e Inmunología Veterinaria - GIVIVET
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación Año – 2018.A18080161
Ubicación geográfica de la investigación	Laboratorio de Microbiología y Parasitología Sección de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Urbanización: Av. Circunvalación Lote: 2800 Latitud: -12.081524855411857 Longitud: --76.98757895937575
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Noviembre 2018 – julio 2019
URL de disciplinas OCDE	Ciencias Veterinarias https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **martes 17 de diciembre de 2019**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0225-EPMV/FMV-2019, integrado por los siguientes profesores:

Dr. Blgo. Abelardo Lenin Maturrano Hernández	Presidente del Jurado
MV. Mg. Alberto Gustavo Manchego Sayán	Asesor de la Tesis
MV. Mg. Mercy Gisela Ramírez Velásquez	Miembro del Jurado
MV. Dr. Luis Manuel Barrios Arpi	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **ROJAS CHAMOCHUMBI, TATIANA RUBÍ** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“DETECCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES RETINOICOS RAR EN LA MUCOSA INTESTINAL DE CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*)”.

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por
MATURRANO HERNANDEZ
Abelardo Lenin FAU 20148092282
soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 13.10.2023 09:05:15 -05:00

Abelardo Maturrano Hernández: Dr. Blgo. Prof. Principal. D.E

Mercy Gisela Ramírez Velásquez: MV. Mg. Prof. Asociado. D.E

Alberto Gustavo Manchego Sayán: MV. Mg. Prof. Principal, D.E

Luis Manuel Barrios Arpi: MV. Dr. Prof. Asociado DE.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
 ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0225-EPMV/FMV-2019



UNMSM

Firmado digitalmente por
 MATURRANO HERNÁNDEZ
 Abelardo Lenin FAU 20148092282
 soft
 Motivo: Soy el autor del documento
 Fecha: 13.10.2023 09:05:44 -05:00

PRESIDENTE:

.....
ABELARDO LENIN MATURRANO HERNÁNDEZ

MIEMBROS :



ALBERTO GUSTAVO MANCHEGO SAYÁN

ASESOR DE LA TESIS

:



MERCY GISELA RAMÍREZ VELÁSQUEZ

:



LUIS MANUEL BARRIOS ARPI

San Borja, 12 de octubre del 2023

V° B°



UNMSM

Firmado digitalmente por SANTIANI
 ACOSTA Alexei Vicent FAU
 20148092282 soft
 Motivo: Soy el autor del documento
 Fecha: 02.11.2023 09:57:36 -05:00

.....
Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Alberto Gustavo Manchego Sayán en mi condición de asesor acreditado con la resolución Decanal N° 0225-EPMV/FMV-2019 de la tesis, cuyo título es "Detección y expresión de los receptores retinoicos RAR en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*vicugna pacos*)" presentado por la bachiller Tatiana Rubí Rojas Chamochumbi para optar el título de Médico Veterinaria, CERTIFICO que ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 18% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Alberto Gustavo Manchego Sayán

Asesor de Tesis

DNI: 15619652

DEDICATORIA

A mi madre, con su amor y esfuerzo me permitió cumplir cada uno de mis objetivos trazados. Todo lo que soy es gracias a ella.

A cada uno de los integrantes de mi familia, gracias por su confianza y apoyo incondicional en cada paso de mi vida. A mi hermanito Mathias, mis hermanas y primos menores. Sé que ellos podrán cumplir sus metas al igual que yo las estoy cumpliendo.

Al Dr. Alberto Manchego, por su paciencia en el desarrollo de la tesis. Por sus consejos y cada charla constructiva.

A la familia de Ictiopatología, sobre todo a la doctora Nieves Sandoval, por su gran cariño y motivación que me dio desde el ingreso al laboratorio.

A mis compañeros y grandes amigos que me acompañaron en el transcurso de éste camino.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UNMSM, a la FMV, por permitirme formar parte de ésta gran familia, por dejar gratos recuerdos en cada una de sus aulas. A mis profesores, y mis compañeros, futuros colegas.

Miguel Rojas, quien con su dirección y conocimiento, permitió el desarrollo de éste trabajo.

Gracias a Lesly, Juli , Piera, Ale, Kathy y Caro por estar en cada momento, gracias por su apoyo y su amistad.

Gracias Abuelito, por ser mi ejemplo de vida, por enseñarme que todos podemos salir adelante simplemente echándole ganas y soñando.

Poniendo a la familia siempre primero, y fomentándome a estudiar y a ser mas curiosa cada día, trazándome siempre metas.

ÍNDICE

	PAG.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
Índice de figuras	3
Índice de cuadros.....	4
Índice de anexos	5
I. Introducción	¡Error! Marcador no definido.
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. El ácido retinoico	7
2.1.1. La importancia del Ácido Retinoico en la mucosa intestinal	7
2.1.2. Metabolismo del ácido retinoico	9
2.1.3. Receptores del ácido retinoico	11
2.2. La alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	13
2.2.1. La importancia de la ingestión del calostro en las crías de camélidos sudamericanos .	14
2.3. Inmunidad en la mucosa intestinal	15
2.3.1. Mecanismos protectores innatos de la mucosa.....	15
2.3.2. Mecanismos protectores adaptativos de la mucosa intestinal	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Población y muestra	18
3.2. Elaboración de cebadores o <i>primers</i>	18
3.3. Obtención y procesamiento de muestras	19
3.3.1. Aislamiento del ADN genómico de los Receptores RAR.....	19
3.3.2. Aislamiento de ARNm de yeyuno.....	20
3.4 Análisis de la información.....	23
IV. RESULTADOS.....	24
4.1 Análisis de diseño de <i>primers</i> para RAR α	24
4.2. Determinación de los genes de RAR α	24
4.3. Expresión del receptor RAR α en la mucosa yeyunal de crías de alpaca.....	24
4.4. Cuantificación relativa de ARNm del receptor RAR α	26
V.. DISCUSIÓN.....	28

IV.	CONCLUSIONES.....	31
VII.	RECOMENDACIONES.....	22
VIII.	LITERATURA CITADA.....	33
IX.	ANEXOS.....	40

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo detectar el gen del receptor RAR α del ácido retinoico en alpacas adultas y su expresión en la mucosa yeyunal de crías de alpaca. Para la detección del gen, se utilizaron leucocitos sanguíneos de 5 alpacas adultas aparentemente sanas, sin distinción de raza o sexo; mientras que la expresión se determinó en 30 muestras de yeyuno de crías de alpacas aparentemente sanas, con edades de 1 a 47 días, con ingestión de calostro y 3 muestras de recién nacidos sin ingestión de calostro que se utilizaron como calibradores para la cuantificación relativa de la expresión. Se tomaron 5 muestras de 5 ml de sangre entera obtenidas por punción yugular de 5 alpacas adultas, se mezclaron para formar 2 pools y se continuó el procedimiento para obtener el ADN genómico utilizando el método del kit “PureLink™ Genomic DNA Mini Kits” (Invitrogen, USA). Este ADN sirvió de templado para realizar la PCR con *primers* específicos para el RAR α . Las secciones de los 33 yeyunos se procesaron con Trizol® Reagent, para obtener el ARN total y luego realizar la RT qPCR con *primers* específicos y cuantificar relativamente el ARN mensajero de los receptores, utilizando el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. El PCR convencional amplificó un producto de 626 pb con los *primers* específicos para determinar la presencia del gen en el genoma de leucocitos; y el producto de RT-PCR con *primers* diseñados, amplificaron un producto específico de 108 pb. En la cuantificación relativa de los ARN mensajeros del gen RAR α , todas expresaron al receptor. Se concluye que el gen del receptor RAR α está presente en el genoma de las alpacas y se expresa en la mucosa yeyunal de las crías de alpaca.

Palabras claves: receptores retinoicos, PCR, RT-qPCR, ARN mensajero, mucosa yeyunal, crías de alpaca.

ABSTRACT

The present study aimed to detect the retinoic acid receptor RAR α gene in adult alpacas and its expression in the jejunal mucosa of alpaca calves. For the detection of the gene, blood leukocytes of 5 apparently healthy adult alpacas were used, regardless of race or sex; while the expression was determined in 30 samples of jejunum from apparently healthy alpaca offspring, aged 1 to 47 days, with ingestion of colostrum, and 3 samples of newborns without ingestion of colostrum that were used as calibrators for the relative quantification of expression. 5 samples of 5 ml of whole blood obtained by jugular puncture of 5 adult alpacas were taken, mixed to form 2 pools and follow the procedure to obtain the genomic DNA using the method of the "PureLink™ Genomic DNA Mini Kits" kit (Invitrogen, USES). This DNA served as a temper to perform PCR with primers specific for RAR α . The sections of the 33 jejunum were processed with Trizol® Reagent, to obtain the total RNA and then perform the qPCR RT with specific primers of the gene and perform the relative quantification of the amount of messenger RNA of the receptors, using the method $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Conventional PCR amplified a 626 bp product with specific primers to determine the presence of the gene in the leukocyte genome and the RT-PCR product with primers designed for RT PCR amplified a specific 108 bp product. In the relative quantification of the messenger RNAs of the RAR α gene, all expressed to the receiver. It is concluded that the RAR α receptor gene is present in the alpacas genome and is expressed in the jejunal mucosa of alpaca pups.

Keywords: retinoic receptors, PCR, RT-qPCR, messenger RNA, jejunal mucosa, alpaca calves.

Índice de figuras

	Pág.
Figura N°1: Papel de la ácido retinoico en las células inmunes.	8
Figura N°2: Metabolismo del ácido retinoico.	10
Figuro N°3: PCR convencional para determinar la presencia de RAR α con la utilización de <i>primers</i> de secuenciamiento.	24
Figura N°4: Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GAPDH en intestino de alpaca.	25
Figura N°5: Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados del receptor RAR α .	25
Figura N°6: Curva de amplificación (Ct) para RAR α	26
Figura N°7: Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados del para RAR α .	26
Figura N°8: Niveles de expresión promedio de ARNm de RAR α en mucosa yeyunal de crías de alpacas.	27

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro N°1: Taxonomía de la alpaca.	14
Cuadro N°2: Oligonucleótidos diseñados para la qRT- PCR para los genes de RAR α .	18
Cuadro N°3: Oligonucleótidos diseñados para el secuenciamiento de los genes de RAR α .	19

Índice de anexos

	Pág.
Anexo N°1: Código de identificación de cada animal y edad de las crías de alpaca.	40-41
Anexo N°2: Alineamiento de los <i>primers foward</i> para la evaluación de RAR α en intestino de alpaca.	42
Anexo N°3: Alineamiento de los <i>primers revers</i> para la evaluación de RAR α en intestino de alpaca.	43
Anexo N°4: Resultados de la cuantificación relativa del ARNm de RAR α en la mucosa yeyunal de crías de alpaca (<i>Vicugna pacos</i>) con respecto al calibrador.	44

I. INTRODUCCIÓN

El ácido retinoico (AR), metabolito activo de la vitamina A, actúa en diferentes condiciones biológicas, como el desarrollo pre y posnatal. Además, es importante en la respuesta inmune debido a que ayuda a mantener la homeostasis de la barrera intestinal, modular la inmunidad y la tolerancia, promoviendo la diferenciación de las células T reguladoras y efectoras (Sun *et al.*, 2007) y la producción de inmunoglobulina A (Surman *et al.*, 2014). También se ha demostrado ser un agente “antiinfeccioso” (Semba, 1999), y cumplir un papel importante en el control de enfermedades inflamatorias en diversos órganos (Harirchian y Abdolahi, 2016). Los efectos del AR están mediados a través de su interacción con sus receptores nucleares, como los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X de retinoide (RXR), (Balmerand *et al.*, 2002) para regular la transcripción de varios genes diana (Hall *et al.*, 2011).

Por su extensa superficie de absorción de nutrientes, el intestino es un lugar potencial para la invasión de patógenos; por ello, es importante la respuesta inmune de la mucosa intestinal, el cual establece mecanismos de reconocimiento y respuesta tanto innata como adaptativa (Yuan y Walker, 2004).

En la actualidad, existen tres secuencias para el genoma completo de la alpaca disponible en el *GenBank*: *VicPac1* (versión 1.0), *VicPac2* (versión 2.0.1) y *VicPac3.1* del ADN de una alpaca hembra Huacaya (Carlotta). Sin embargo los genes de las variantes de RAR son predictivos, es decir que se han determinado por análisis bioinformático no confirmados en otras alpacas con estudios moleculares. Por ello, es importante confirmar su presencia y establecer la expresión del receptor RAR en la mucosa intestinal de crías de alpaca a fin de buscar estrategias de uso del ácido retinoico para favorecer la activación del sistema inmune de la mucosa intestinal, y así manejar eficientemente esta respuesta, buscando mejorar la salud de las crías de alpaca.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El ácido retinoico

El ácido retinoico (AR) es el metabolito activo de la vitamina A. Actúa en diferentes condiciones biológicas, como el desarrollo pre y pos natal. Se ha demostrado que su implicancia en la salud de la gestante, el mantenimiento de la placenta, y el desarrollo embrionario (Spiegler *et al.*, 2011); así como su participación en la promoción de la buena visión, el mantenimiento y modulación de la respuesta inmune y la homeostasis de los tejidos epiteliales y mucosa (Mora *et al.*, 2008) (Cassani *et al.*, 2012). Mellanby y Green identificaron, en 1920, a la vitamina A como un agente “antiinfeccioso”, posteriores estudios siguieron demostrando que su suplementación puede reducir la morbilidad y mortalidad en infecciones respiratorias, sarampión, sepsis puerperal y muchas otras (Semba, 1999).

Las células convierten la vitamina A en varios compuestos relacionados, conocidos colectivamente como retinoides (retinol y su derivado del AR). El AR es una potente molécula reguladora que controla la expresión de genes a través de los receptores RAR (α , β y γ) y RXR (α , β y γ) que pertenecen a la familia de receptores nucleares que activan la transcripción de genes diana específicos (Germain *et al.*, 2006).

El epitelio intestinal desempeña un papel central en el metabolismo de los retinoides al absorber la vitamina A de la dieta y expresar las enzimas generadoras de RA y sus receptores (Harrison *et al.*, 2005) (Jijon *et al.*, 2019). Esto sugiere que el epitelio podría ayudar a regular la inmunidad adaptativa dependiente de la vitamina A.

2.1.1. La importancia del Ácido Retinoico en la mucosa intestinal

La importancia de la vitamina A en el mantenimiento de la estructura y función del tracto gastrointestinal se ha demostrado en varios estudios en animales, mediante el aumento de la barrera del epitelio intestinal con la suplementación con vitamina A; y el adelgazamiento, con la privación de la misma (Zile *et al.*, 1977; Li y Tso, 2003). Las ratas deficientes en vitamina A redujeron significativamente la altura de las vellosidades, la sacarasa y las actividades de maltasa (Warden *et al.*, 1997, Li y Tso, 2003), alteraron la migración celular y alteraron la síntesis de proteínas de la mucosa a nivel de la traducción (Zaiger *et al.*, 2004).

Luego de que la Vitamina A se metaboliza a AR en los enterocitos, desempeña un papel crítico en la respuesta inmune de la mucosa intestinal como una señal reguladora, induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias, promoviendo la diferenciación de células reguladoras

y efectoras (T y B) (Sun *et al.*, 2007) (Hall *et al.*, 2011), la producción de inmunoglobulina A (Surman *et al.*, 2014), además de modular a las células inmunes innatas, como las células linfoides innatas (ILC, por sus siglas es inglés) (Kim *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el AR desempeña un papel importante en el control de enfermedades inflamatorias no solo en el intestino (Tejón *et al.*, 2015) sino también en otros tejidos, como el sistema nervioso central y la mucosa pulmonar (Harirchian y Abdolahi, 2016). Por ello, el papel del AR es importante para mantener la homeostasis de la barrera intestinal y para equilibrar la inmunidad y la tolerancia.

La deficiencia de vitamina A altera la integridad del epitelio mucosal. Como consecuencia, se observa una mayor susceptibilidad a diversos patógenos en el ojo, tracto respiratorio y gastrointestinal. Los niños con déficit de vitamina A presentan mayor riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias (Sommer y Tarwotjo, 1984) y una mayor gravedad de las enfermedades diarreicas (Barreto *et al.*, 1994). Un déficit de vitamina A se asocia con la disminución de la fagocitosis de los macrófagos activados durante la inflamación (Ramakrishnan *et al.*, 2004) y con un número y actividad reducida de células asesinas naturales (NK) (Dawson *et al.*, 1999). El aumento de la producción de IL12 (que promueve el crecimiento de células T) y el TNF- α proinflamatorio (acción microbicida activadora de los macrófagos) en un estado deficiente de vitamina A puede promover una respuesta inflamatoria excesiva, pero la suplementación con vitamina A puede revertir estos efectos.

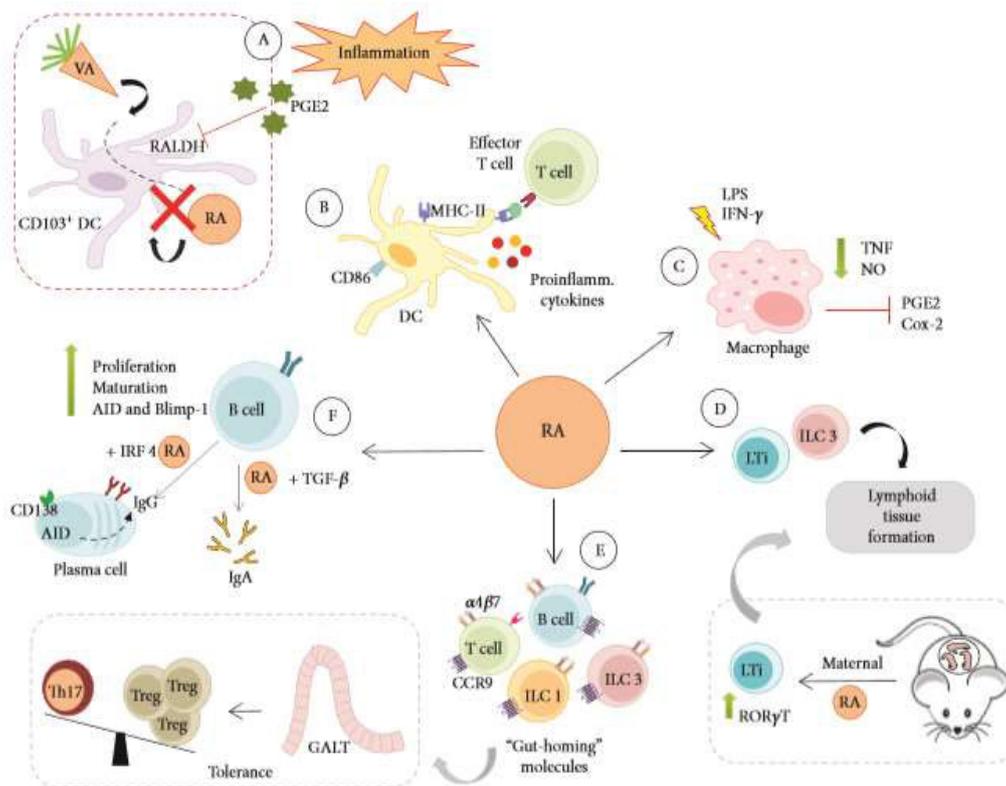


Figura n°1 .Papel del ácido retinoico en las células inmunes. El ácido retinoico actúa en diferentes células del sistema inmune (innato y adaptativo). (A) Sin embargo, en un entorno inflamatorio (cuadro rojo), la PGE2 liberada durante la respuesta inflamatoria inhibe la enzima RALDH que se requiere para la síntesis de RA. Cuando se libera AR, actúa de la siguiente manera: (B) El AR, junto con las citoquinas inflamatorias, contribuye a la activación de las CD y la generación de células T efectoras; (C) El AR promueve la modulación de macrófagos, inhibiendo los mediadores inflamatorios y la liberación de TNF y NO; (D) El AR da inicio a las células inmunes innatas como las células linfoides innatas (ILC), que son necesarias para la formación de tejido linfoide. (E) El induce la expresión de las moléculas $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en linfocitos e ILC y la orientación de estas células en el intestino y promueve el equilibrio de células Th17 / Treg en la GALT, asegurando la tolerancia, pero también es capaz de inducir Th17 en la presencia de infección e inflamación; y (F) RA promueve la activación de los linfocitos B y su diferenciación hacia células plasmáticas secretoras (Mendonça *et al.*, 2018).

2.1.2. Metabolismo del ácido retinoico

Los vertebrados obtienen la vitamina A a través de la dieta, principalmente a partir de carotenoides de plantas o de carne (Bono *et al.*, 2016). La captación inicial de la vitamina A en la dieta esta mediada a través de las células del epitelio intestinal (IEC) del intestino delgado, donde se esterifican a retinil ésteres por la enzima retinol aciltransferasa (LEAT). Los retinil ésteres son llevados como quilomicrones hacia la circulación (Erkelens *et al.*, 2017) y transportados a los tejidos objetivo o a los hepatocitos para su almacenamiento (células estrelladas hepáticas) donde se hidrolizan para formar el retinol para su almacenamiento (Harrison, 2012). Algunos ésteres de retinilo se almacenan fuera del hígado como gotitas de lípidos en las células intersticiales y en órganos como el pulmón, el riñón y el intestino (Blomhoff *et al.*, 2006).

Cuando el organismo necesita AR, el retinol formado se une a la proteína de unión al retinol (RBP) en el hígado y se transporta a través de la sangre hacia las células diana (Azais - Braesco *et al.*, 2000). Este complejo es captado por las células diana a través del receptor estimulado por el ácido retinoico 6 (STRA6) (Berry *et al.*, 2012). En la célula objetivo, el retinol libre se hidroliza a retinaldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en una reacción reversible (Bono *et al.*, 2016). Una segunda hidrólisis conduce a la formación irreversible a AR y está mediada por las deshidrogenasas de la retina (RALDH) específica de la célula (Mora *et al.*, 2008). Se ha identificado RALDH en algunas células del epitelio intestinal, las CD y los macrófagos asociados con los ganglios linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer. (Mora *et al.*, 2008). El

AR puede permanecer en la célula diana o unirse a las proteínas de unión al AR (CRABP) celulares. Cuando se une a CRABPI, el AR se dirige a su degradación, mientras que CRABPII transporta al AR al núcleo, donde se une con los receptores nucleares (RAR y/o RXR) y promueve la transcripción de genes diana del AR (función autocrina) (Dong *et al.*, 1999). Además, el AR puede salir de la célula y entrar en otra cercana (función paracrina) o continuar circulando en el cuerpo (Theodosiou *et al.*, 2010).

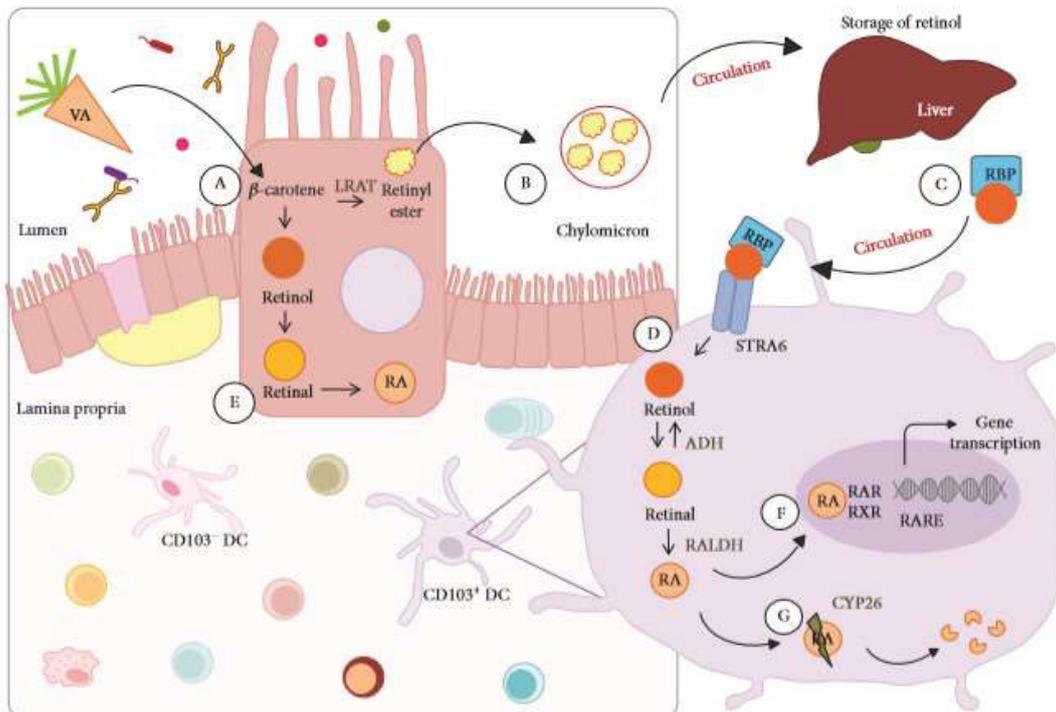


Figura n°2. Metabolismo del ácido retinoico (A) La vitamina A y sus precursores (β -caroteno) obtenidos de la dieta se absorben por las células intestinales y se esterifican en retinil ésteres por la enzima lecitina retinol aciltransferasa (LRAT). (B) Los ésteres de retinil están llenos de quilomicrones y entran a la circulación general donde finalmente se almacenan en el hígado como retinol. (C) El retinol se une a la proteína de unión al retinol (RBP) en el hígado y se transporta a través del torrente sanguíneo. Este complejo se reconoce a través del receptor estimulado por el ácido retinoico 6 (STRA6), que media la absorción de retinol extracelular al citosol. (D) En la célula objetivo, el retinol libre se hidroliza a retinaldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en una reacción reversible. Una segunda hidrólisis conduce a la formación irreversible a AR y está mediada por las deshidrogenasas de la retina (RALDH) para generar RA. (F) El RA se une a sus receptores nucleares (RAR y/o RXR) con el fin de regular la transcripción de varios genes diana (Mendonça *et al.*, 2018).

2.1.3. Receptores del ácido retinoico

Los efectos del AR están mediados a través de su interacción con sus receptores nucleares, como los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores X de retinoide (RXR), formando heterodímeros RAR – RXR que interactúan con los elementos que responden al ácido retinoico (RARE) en el ADN (Balmerand *et al.*, 2002) para regular la transcripción de varios genes diana (Hall *et al.*, 2011) (Schuster *et al.*, 2008).

En los vertebrados generalmente forman heterodímeros; RAR comprende tres subtipos principales (α , β y γ) que interactúan con todas las formas del AR, mientras que RXR, que también tiene las subtipos (α , β y γ), interactúa principalmente con 9 – cis RA (Hjertson *et al.*, 2003). La mayoría de las células expresan uno o más de los subtipos de RAR y RXR en varias combinaciones, lo que influye enormemente en la complejidad de la señalización de los retinoides.

A. Receptores RAR

Los receptores de ácido retinoico (RAR) se aislaron por primera vez en virtud de su similitud de secuencia con otros receptores nucleares en la región de unión al ADN. Los RAR α fueron clonados inicialmente por los grupos de Pierre Chambon y Ronald (Petkovich *et al.*, 1987; Giguere *et al.*, 1987). Poco después, se identificaron dos RAR adicionales (RAR β y RAR γ) (Evans, 2004; Chambon, 2004). Posteriormente fueron aislados en diversos tipos de vertebrados.

Cada subtipo de RAR presenta una sensibilidad diferente a diferentes concentraciones de AR: para activar los RAR α se necesita altas concentraciones de AR, a diferencia de RAR γ que requiere la menor cantidad de ligando para su activación (Bread *et al.*, 2002).

Los receptores RARs tiene una organización de dominios bien definida y estructura que consiste en un dominio N-terminal variable (NTD) y dos dominios bien estructurados y altamente conservados, un dominio de unión a ADN central (DBD) y un dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) (Bastien y Rochette-Egly, 2004; Rochette-Egly y Germain 2009). Aunque estos receptores nucleares son muy similares en estructura, existen diferencias pequeñas entre ellos, las cuales están bien conservadas a lo largo de la evolución, lo que sugiere que cada RAR puede cumplir diferentes funciones (Petkovich, 1992). Asimismo, los diferentes subtipos se expresan diferencialmente en tejidos diana retinoides.

A.1. RAR α .

El *GenBank* describe 4 variantes para RAR α (x1, x2, x3 y x4) para alpacas. Se han hecho diversos estudios de acuerdo a las funciones e interacciones del subtipo de receptor retinoide

RAR α . Estudios en murinos con deficiencia del receptor RAR α evidenciaron características de deficiencia de vitamina A con disminución de la viabilidad, la deficiencia de crecimiento y la esterilidad masculina, debido a la degeneración del epitelio seminífero, así como otras malformaciones congénitas, como los dígitos de las hojas (Kin Ting Kam et al., 2012).

La supresión específica de RAR α en células T lo identificó como la isoforma RAR esencial en el control de la diferenciación y acumulación funcional de efectores de la mucosa. Mostrando que RAR α regula la regulación positiva inducidas por RA del receptor α 4 β 7 y CCR9 en las células T CD4⁺ *in vitro*. Además, RAR α también controla la supervivencia de las células T CD4⁺ tras la activación *in vitro* e *in vivo* (Guo et al., 2014).

Otro estudio demostró que la interacción RA-RAR α es crítico para el mantenimiento del linaje de células Th1, demostrando que RA-RAR α regula directamente la actividad potenciadora en los genes que definen el linaje de las células Th1 mientras reprime los genes que regulan el destino de las células Th17 (Brown et al., 2015).

Se demostró la participación de éste receptor en el establecimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal en murinos, donde la eliminación de RAR α dentro de los enterocitos reveló la alteración de la diferenciación y función de la barrera epitelial, generando un aumento notable en el número de células caliciformes y células de Paneth, así como en una disminución en el número de células enteroendocrinas, composición de la microbiota, además de la disminución de las ILC y de los folículos linfoides (que contienen células B) aislados en el colon. lo que afecta ampliamente la composición y la función del sistema inmunitario de la mucosa intestinal. (Jijon et al., 2019).

Estudios recientes determinaron los patrones de expresión del receptor RAR α en niños con malformación anorrectal, tomando como muestras el intestino y recto de humanos recién nacidos y ratones con malformaciones anorrectales (ARM), siendo analizados por las técnicas de RT-qPCR e inmunohistoquímica y la transferencia de Western, determinando la presencia intranuclear de los recetores RAR α y su expresión en menor cantidad en muestras de recto de pacientes con ARM que en las muestras de pacientes controles (Wang et al., 2019).

A.2. RAR β

A la fecha, se han descrito cinco variantes transcripcionales para RAR β en alpacas (GenBank, 2018). Gatuua et al. (2019), demostró la participación del RAR β epitelial para el desarrollo y regulación de las respuestas inmunitarias adaptativas que dependen de la vitamina A, como el desarrollo de T CD4⁺ que estimulan el intestino y células B que producen IgA, así como la

regulación de la producción de IL-17 por las células Th17. Ampliando el conocimiento sobre cómo el epitelio intestinal detecta el estado de la vitamina A en la dieta para controlar la inmunidad adaptativa dependiente de la vitamina A.

Varias investigaciones evidenciaron la pérdida progresiva de RAR β durante la carcinogénesis de los NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) y su ausencia en la carcinogénesis de células epiteliales dando la hipótesis de que el receptor retinoico RAR β podría actuar como supresor tumoral (Brabender *et al.*, 2005). Por ello se infería que activando éstos receptores se podría revertir éste hecho, sin embargo, estudios posteriores demostraron que unas altas expresiones de dicho receptor en los tejidos tumorales están asociadas a un mal pronóstico. (Mauro *et al.*, 2008). Esto puede estar explicado por la existencia de diferentes variables del mismo receptor (1, 2, 3, 4) (Chambon, 1996) (Zelent *et al.*, 1991) los cuales tendrían diferentes funciones. Por ejemplo, la variable RAR β 2 interviene en el crecimiento y la inducción de la apoptosis inducida por AR en células de cáncer de pulmón, mientras que RAR β 4 parecería predisponer al tejido pulmonar a la hiperplasia y neoplasia (Berard *et al.*, 1994). Si esto es así, niveles aumentados de RAR β 4 podrían asociarse a peor pronóstico.

A.3. RAR γ

Se identificó por primera vez en murinos, expresados altamente en la piel (Krust *et al.*, 1989). En la actualidad presenta dos variantes (1 y 2) (*GenBank*, 2008). Los ratones RAR γ nulos muestran algunos defectos asociados con la deficiencia de vitamina A, que se puede revertir con el tratamiento con AR, demostrando que el RAR γ media algunas de las funciones retinoides *in vivo* (Lohnes *et al.*, 1993). En dicho estudio también se observaron defectos como dígitos palmeados, transformaciones homeóticas y malformaciones de las vértebras cervicales.

2.2. La alpaca (*Vicugna pacos*)

Perú ocupa el primer lugar en el mundo en la producción de alpacas y vicuñas, y el segundo en llamas, después de Bolivia. Nuestro país alberga el 87% de la población mundial de alpacas seguido de Bolivia con el 9.5%. Según el Censo Nacional Agropecuario 2012, el Perú cuenta con 3'685516 cabezas (Minagri, 2013). La población de alpacas se encuentra distribuida en 17 departamentos, siendo Puno y Cusco los que concentran la mayor producción con 1'459.903 y 545.454, respectivamente le sigue Arequipa (468 392), Huancavelica (308 586), Ayacucho (230 910) entre otras regiones (Minagri, 2013).

Las alpacas contribuyen a la economía familiar del poblador andino y aporta a la seguridad alimentaria y nutricional, así como al ecoturismo (FAO, 2015). Además de ser una de las fuentes

principales de proteína para los grupos familiares que viven a más de 3 800 msnm, gracias a su buena adaptación a éstos entornos y la capacidad para enfrentarse a la variabilidad del cambio climático (FAO, 2017).

Cuadro N.1 Taxonomía de la alpaca (Gentry *et al.*, 2004).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Artiodactyla
Familia	Camelidae
Género	<i>Vicugna</i>
Especie	<i>Vicugna pacos</i>

La alpaca se utiliza principalmente por su fibra, siendo nuestro país el primer productor en cuanto a fibra en el mundo; respecto a su carne, está destacando en los últimos años debido al impulso en la gastronomía, su alto valor nutritivo y saludable en bajo contenido de colesterol, y su similitud con otras carnes rojas como la del vacuno y ovino, además de que se presta a innumerables operaciones. (MINAGRI, 2015). Además, es una fuente de fertilizante orgánico que garantiza la producción agrícola de subsistencia; y de subproductos (cuero, pieles, etc.). Asimismo, su crianza está vinculada con el empoderamiento de las mujeres que participan en la elaboración y comercialización de su fibra y las tareas de pastoreo (FAO, 2017).

Los primeros estudios citogenéticos y cromosómicos en la alpaca, han sido descritos recientemente (Ávila *et al.*, 2014). En la actualidad, existen tres secuencias para el genoma completo de la alpaca disponible en el *GenBank*: VicPac1 (versión 1.0), VicPac2 (versión 2.0.1) y VicPac3.1 del ADN de una alpaca hembra Huacaya (Carlotta). El ensamblaje VicPac1, fue generado por el instituto Broad, el segundo, por la universidad de Washington y el VicPac3.1, por la University of Veterinary Medicine - Austria (Richardson *et al.*, 2019); todos ellos mediante análisis bioinformáticos.

2.2.1. La importancia de la ingestión del calostro en las crías de camélidos sudamericanos

Los camélidos sudamericanos al presentar una placenta epiteliocorial, que impide la transferencia pasiva de anticuerpos, nacen con hipogammaglobulinemia grave (Guerra *et al.*, 2014). La protección del sistema inmune de las alpacas neonatas se basa en la ingestión adecuada de calostro de buena calidad, así como una eficiente permeabilidad intestinal. Cuando hay una

falla en éstas dos variables, existe una reducción en la transferencia pasiva de anticuerpos, por ende un aumento en la mortalidad.

El calostro de diversas especies presenta gran cantidad de proteínas, vitaminas liposolubles E, A, K y carotenos; así como altos niveles minerales, sodio, zinc, hierro, azufre, potasio, selenio y manganeso. Su contenido de ácidos grasos se relaciona con la dieta materna (Salazar *et al.*, 2009). El calostro es importante para asegurar la inmunidad en el neonato, y uno de los componentes más importantes son las inmunoglobulinas, donde en alpacas destaca la IgG. Se ha demostrado en diversos estudios sus altas concentraciones durante los primeros 4 días post parto, la cual disminuyó significativamente desde el día 1 ($26.319 \pm 8.754.73\text{mg/dl}$) hasta el día 4 ($3848,8 \pm 3475,91 \text{ mg/dl}$) (Möbler *et al.*, 2022).

2.3. Inmunidad en la mucosa intestinal

Nuestro organismo se encuentra protegido por mecanismos de defensa, específicos e inespecíficos, que conforman el sistema inmune; el cual cumple esenciales funciones como protección, vigilancia y el mantenimiento de la homeostasis del organismo. La mucosa intestinal es una interfase de nuestro cuerpo, y en ella podemos encontrar gran cantidad de moléculas extrañas, microorganismos comensales y otros patógenos (Tizard, 2009). Así, el sistema inmune de las mucosas cumple tres funciones primordiales: inducción de tolerancia, adaptación al medio y la de protección (Vega, 2007).

El sistema inmunitario gastrointestinal es uno de los más extensos y complejos (Tizard, 2009). Por su gran superficie de absorción de nutrientes, el tracto gastrointestinal es un lugar potencial para el ataque y la invasión de microorganismos patógenos. La inmunidad innata y adaptativa son dos mecanismos importantes para la protección de los organismos (Yuan y Walker, 2004). Dentro de la inmunidad innata existen barreras fisicoquímicas y celulares; y dentro de la inmunidad adaptativa participan los linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia, placas de Peyer, citoquinas e Ig A secretoria (Mayer, 2003).

2.3.1. Mecanismos protectores innatos de la mucosa

La inmunidad innata es la primera barrera que tiene nuestro organismo para defenderse de microorganismos invasores (Marshall y Arenas, 2003). El tracto gastrointestinal posee barreras fisicoquímicas de inmunidad innata que incluye movimientos peristálticos, secreción de moco, sales biliares, enzimas digestivas, sustancias antimicrobianas (como la lactoferrina, lisozima, el sistema de lactoperoxidasa y las α defensinas, proteínas secretadas, y células de defensa (epiteliales, dendríticas, polimorfonucleares, etc.) (Oppenheim *et al.*, 2003; Weinberg *et al.*, 1998; More *et al.*, 2010).

La producción de saliva en la cavidad oral, ejerce un efecto mecánico de barrido en diferentes patógenos; contiene lisozima, con acción bactericida; lactoferrina, con acción bacteriostática,

impidiendo la utilización del hierro por los patógenos; aglutininas (mucinas, fibronectina, 2-microglobulina); además de secretar inmunoglobulinas (Ig A, Ig M e Ig G) que bloquean la adherencia, aglutinan bacterias y neutralizan virus (Tizard, 2009).

El pH gástrico y duodenal, sirven como una barrera contra los patógenos; además de la microbiota bacteriana residente, la cual compete con los gérmenes patógenos por los nutrientes, produciendo sustancias bacteriostáticas, y manteniendo el pH y la tensión de oxígeno bajos en el tracto gastrointestinal (Tizard, 2009).

Los enterocitos son la primera barrera física de defensa en el tracto intestinal. Estas células mantienen la integridad de la barrera al tener uniones estrechas entre ellas, además de que algunas producen moco que recubre el epitelio, evitando el contacto de las bacterias con el mismo (Vega, 2007). Las células de Paneth secretan péptidos antimicrobianos como las defensinas alfa, quienes evitan la invasión de microorganismos a los enterocitos. Las enzimas proteolíticas presentan efectos que alteran la composición de antígenos (Mayer, 2003). Las células dendríticas localizadas en la superficie de la mucosa intestinal, median el inicio de la inmunidad antimicrobiana y la mantención de la inmunotolerancia. Los polimorfonucleares, fagocitan, ingieren y destruyen bacterias, hongos y parásitos por medio de mecanismos dependientes e independientes de O₂. Todo esto forma una formidable barrera fisicoquímica que protege al organismo de potenciales patógenos (Colonna *et al.*, 2006).

La fagocitosis y la quimiotaxis son mediadas por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF-A) y la interleucina 1 alfa (IL-1a) (Abbas *et al.*, 2008). Bardales (2013) estudió la expresión del TNF-a y la IL-1a en la mucosa de crías de alpaca, teniendo como resultado una alta y creciente expresión durante las cuatro primeras semanas de vida, relacionándose a la ingesta paulatina de pasturas en la dieta del neonato, por tanto un enfrentamiento constante del sistema inmunológico. Además se observó un decrecimiento en su expresión en la semana quinta y sexta, relacionándolo al establecimiento de la flora intestinal y a la inmunotolerancia.

2.3.2. Mecanismos protectores adaptativos de la mucosa intestinal

El sistema inmune adaptativo, a diferencia del innato, confiere memoria inmunológica de largo y corto accionar ante un nuevo ataque de patógenos reconocidos con anterioridad, además de poseer especificidad a algunos componentes bacterianos (Mayer, 2003).

Las Placas de Peyer (PP), principal sitio inductor de la respuesta inmune intestinal, constituye el GALT (tejido linfoide asociado a intestino). En su epitelio están presentes las células M encargadas de “muestrear” el contenido del tracto intestinal, desde del lumen hasta la cúpula de las Placas (Ramiro-Puig *et al.*, 2008). Los antígenos endocitados por las células M son llevados a

las células dendríticas (DC), que expresan superficialmente el complejo de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), capacitándolas como células presentadoras de antígeno (APC). Después de la captación de antígenos, migran hacia la parte interna de las PP interactuando con los linfocitos T vírgenes (Hernández y Alvarado, 2001), Luego que se estimula los linfocitos T y B, proliferan y se desplazan a los ganglios linfáticos regionales (mesentéricos.). Posteriormente viajan a través de la sangre, y llegan a otras mucosas del organismo (glándula mamaria y los tractos respiratorio y genitourinario) (Tizard, 2009). Al llegar a las mucosas, se diferencian, convirtiéndose en células efectoras, ya sea linfocitos B (células plasmáticas productoras de anticuerpos) o linfocitos T (células productoras de citocinas) (Tizard, 2009).

Los linfocitos T vírgenes estimulados se diferencian en dos subpoblaciones: Th1 (estimuladores de la respuesta inmune celular), o Th2 (estimuladores de la respuesta inmune humoral) (Abumohor, 2005). Cuando un patógeno activa a macrófagos o células NK (Natural Killer), provoca la producción de IL12 y así una respuesta de tipo Th1, induciendo una producción de IFN- γ e IL12 por los Th1 y la actividad citotóxica de las células NK. El IFN- γ estimula una respuesta inmune mediada por células y la destrucción de patógenos intracelulares (García-Hernández *et al.*, 2009). Los linfocitos th2 se activan usualmente por la infección por helmintos y la exposición a alérgenos; éstos secretan citocinas (IL4, IL5, IL13 y TGF- β). La IL4 y la IL13 promueven en los linfocitos B activados el cambio de isotipo para la secreción de Ig G e Ig E. La IL 5 induce la diferenciación y el reclutamiento de eosinófilos y mastocitos en los tejidos, mientras que el TGF- β promueve la activación y diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas generadoras de IgA secretoria (Ramiro-Puig *et al.*, 2008), la cual previene la adherencia de bacterias y virus a las superficies epiteliales, siendo eliminados por exclusión inmune (Favre *et al.*, 2005).

En alpacas se determinó la expresión de IFN- γ e IL-2 (Th1) junto a IL-4 e IL-10 (Th2) desde el nacimiento, la cual presentó una cinética ascendente y gradual, alcanzando su máxima expresión entre la tercera y quinta semana de edad en animales sanos (Chiok, 2012). Dionisio *et al.*(2014) demostraron la expresión constante de IgA, en mucosa yeyunal en alpacas clínicamente sanas, hasta la cuarta semana de edad con disminución discreta en las semanas subsiguientes, a pesar de existir predominio de Th1.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Población y muestra

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Sección de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria, durante el mes de noviembre del 2018 y julio del 2019.

Se trabajó 5 muestras de sangre entera de alpacas adultas aparentemente sanas, sin distinción de raza o sexo, a fin de detectar el gen del receptor RAR α en el ADN genómico de las alpacas. Éstas fueron obtenidas de alpacas criadas en Lima en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM (Lima, Perú), y procesadas en diciembre del 2018.

También se trabajó 33 muestras yeyunales de crías de alpaca provenientes de la estación experimental de IVITA, en el Departamento de Cusco, provincia de Canchis, distrito de Marangani: 30 muestras de alpacas de 1 a 47 días de edad, con ingestión de calostro, con el fin de determinar la expresión del receptor RAR α , y 3 muestras yeyunales de recién nacidas sin ingestión de calostro que se utilizaron como calibradores para su cuantificación. Cabe resaltar todas las muestras se tomaron de animales aparentemente sanos, y conservadas en nitrógeno líquido (-196°C) en las campañas 2014 – 2015, además no se tomó en cuenta el sexo ni raza en ninguno de los casos.

3.2. Elaboración de cebadores o *primers*.

Los *primers* fueron diseñados por la misma sección de Inmunología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM. Se utilizó el software *Primer blast* para la obtención de los *primers* de cada uno de los genes utilizando las secuencias establecidas en el *Genbank* que se muestran en el cuadro 2.

Cuadro n 2. Oligonucleótidos diseñados para la qRT- PCR para los genes de RAR α .

Gen diana	Longitud (pb) ^a	Secuencia de oligonucleótidos ^b	Tm (°C) ^a	Genbank
RAR α	108	F: 5' - TGAGGAACGACCGGAACAAG – 3'	57	XM 06214276.2
		R: 5' - CTTTGCGCACCTTCTCGATG– 3'		
		F: 5' ATCACTGCCACCCAGAAGAC 3'	60.32	Reyes <i>et al</i> , 2017

GADPH 201 R: 5'GCACGTCAGATCCACAACAG 3'

^a. pb: tamaño del producto expresado en pares de bases

^b. F (“*primers*” de avance), R (“*primers*” de regreso)

^c. TM: Temperatura de “*melting*” o de anillamiento “*annealing*”

Cuadro N. 3 Oligonucleótidos diseñados para el secuenciamiento de los genes de RAR α

Gen diana	Longitud (pb) ^a	Secuencia de oligonucleótidos ^b	Tm (°C) ^c	Genbank
		F: 5' - AAGTGGGCATGTCCAAGGAG - 3'		XM
RAR α	650	R: 5' - CCGTTTCCGCACATAGACCT - 3'	57	06214276.2

^a. pb: tamaño del producto expresada en pares de bases

^b. F (“*primers*” de avance), R (“*primers*” de regreso)

^c. TM o Ta: Temperatura de “*melting*” o de anillamiento “*annealing*”

3.3. Obtención y procesamiento de muestras

3.3.1. Aislamiento del ADN genómico de los Receptores RAR

3.3.1.a. Aislamiento de la capa flogística

Se trabajó 5 muestras de 5 ml de sangre entera obtenidas por punción yugular en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA), de 5 alpacas adultas, aparentemente sanas, sin distinción de sexo o raza. Posteriormente, se mezclaron las muestras para formar 2 pools de igual volumen, cada uno su respectivo tubo Falcon, y ser centrifugados a 400 g por 5 min. Se obtuvo tres capas: la capa superior transparente (capa plasmática), una capa inferior roja (capa eritrocítica), y una capa blanca intermedia (capa flogística). Se colectó la capa intermedia, de cada tubo, utilizando una pipeta Pasteur y transfirió inmediatamente a un tubo Falcon. Finalmente se rotuló y fue almacenado en refrigeración para su uso inmediato.

3.3.1.b. Extracción del ADN genómico

Se tomó 200 µl del tubo conteniendo la capa flogística (leucocitos y plaquetas) para ser usado en la extracción de ADN genómico total. Se empleó el kit “*PureLink™ Genomic DNA Mini Kits*” (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado fue almacenado a -20 °C hasta por 24 horas para su posterior uso en la PCR convencional.

3.3.1.c . PCR convencional

Se realizó la PCR para identificar los genes de RAR en ADN genómico de los leucocitos sanguíneos. Se utilizó el “*kit GoTaq® G2 Green Master Mix*” (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, teniendo como molde el ADN extraído de la muestra y una mezcla con *primers* específicos para el gen RAR α y buffer con la ADN polimerasa y los 4 nucleótidos en 25µl como volumen final. El protocolo utilizado fue: una desnaturalización inicial del ADN por 2 minutos a 95 °C y 30 ciclos de: 1.- Desnaturalización a 95°C por 30 segundos, 2.- Alineamiento a 50°C por 30 segundos, 3.- Extensión a 72°C por 1 minuto; y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Los productos obtenidos fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 80 voltios por una hora.

3.3.2. Aislamiento de ARNm de yeyuno

3.3.2.a. Pre- tratamiento del tejido

Las secciones de los 33 yeyunos de las crías de alpacas, mantenidas en nitrógeno líquido (-196 °C), se pesaron para separar 150 mg de tejido de cada muestra y se machacó en un mortero. Durante el proceso de machacado se adicionó pequeñas cantidades de nitrógeno líquido, para la homogenización de las mismas y mantenerlas a bajas temperaturas. Se transfirió cada muestra a un vial de 2 ml de micro centrifuga, adicionando 1ml de agua libre de nucleasas y llevándolo a vortex por 15 segundos y se conservó a -80 °C hasta la extracción del ARN total. Cada muestra fue rotulada para una adecuada identificación (ANEXO n°1).

3.3.2.b. Extracción de ARN total

Se utilizó 300 µl de cada una de las muestras para la extracción de los ARN total. Éstas se colocaron en un tubo de microcentrifuga (Eppendorf) de 2 ml y se le agregó 900 µl del reactivo Trizol® Reagent (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en la utilización de una solución monofásica de fenol, hidroxiquenoleina (inhibidor de ARNasas) con isotiocianato de guanidina para romper la membrana celular, manteniendo la

integridad del ARN. Se homogenizó la muestra e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 240 µl de cloroformo y se homogenizó, incubándolo a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó inmediatamente a 12000g por 15 minutos a 4°C, observándose luego, una separación en tres fases: una fase superior (transparente y acuosa) que contiene el ARN total extraído, una fase intermedia (ADN y proteínas) y una inferior rojiza (fenol, cloroformo). Se extrajo la fase acuosa y se trasladó a un microtubo estéril de 2 ml, precipitando luego el ARN total con 600 µl alcohol isopropílico frío, homogenizándolo e incubándolo inmediatamente por 10 minutos en hielo. Se centrifugó el producto a 12000g por 10 minutos a 4°C, permitiendo la precipitación del ARN total, eliminando inmediatamente el sobrenadante; se procedió a lavar el precipitado con etanol frío al 75%, vortexear y nuevamente a centrifugar a 12000g por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y dejó secar el pellet al medio ambiente por 5 a 10 minutos con la intención de que el etanol se evapore. Finalmente, el ARN extraído fue resuspendido en 30µl de agua libre de nucleasas, se adicionó ADNasas e inactivándola a 60°C durante 15 minutos. El producto final se alicuotó en tubos de 500 µl y se conservaron a -80° C hasta su uso en el RT-qPCR.

3.3.2.c. Síntesis de ADNc (Transcriptasa reversa)

El ARN total obtenido por muestra fue cuantificado con el kit “*ARN Quant-iT™*” (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y el fluorómetro *Qubit™* (Invitrogen, USA). Luego, se realizó diluciones en agua libre de nucleasas con la finalidad de trabajar con 1 µg en un volumen de 2 µl por muestra.

Para la síntesis de ADN complementario, se empleó el “*kit GoScript™ Reverse Transcription Sytem*” (Promega, USA). Éste kit utiliza la transcriptasa reversa a fin de generar ADNc a partir de moléculas de ARN. Además de dicho componente, el kit viene provisto de dNTP, hexámeros al azar (0,2 µM, concentración final), oligo (dT), buffer y sales para optimizar la reacción.

Los componentes de la reacción se prepararon como pre-mezcla. Ésta se conservó en hielo durante su preparación y antes del uso a fin de evitar el inicio de la reacción a temperatura ambiente. A continuación, se muestran las concentraciones finales en un volumen de 25µl por reacción/ muestra.

Agua libre de nucleasas	0.6 µl x n*
5 x Buffer	2. 0 µl x n
Mgcl2 (5mM)	1,2 µl x n
dNTPs 10 mM	0.5 µl x n
<i>primer reverse</i>	0.4 ul x n

Rt enzima	0.3 μ l x n
TOTAL	5.0 μ l x n

n = número de muestras a trabajar

Se dispensó 75 μ l de pre mezcla en tubos individuales con 200 μ l de capacidad. Se añadió 5 μ l de ARN templado (1 μ g de ARN total) de cada una de las muestras en los tubos correspondientes. Las muestras fueron llevadas al termociclador *TurboCycler 2 Blue Ray* BIOTECH (USA) utilizando el siguiente protocolo: 1 ciclo por 25°C durante 5 minutos y 42°C por 45 minutos y mantenidos a 4°C. El ADNc resultante se congeló a -80°C hasta el siguiente paso.

3.3.2.d. qPCR Tiempo Real

Para éste paso se emplearon los oligonucleótidos diseñados por el propio laboratorio, ya mencionados en el Cuadro N.2.

El ADNc fue analizado previamente mediante qPCR cuantitativo en triplicados usando *iQCybr Green Supermix* (Bio-Rad). La cantidad inicial (SQ) de la muestra de ADNc se calculó con curvas estándar de primer específicas usando el *Software* de Análisis de información iCycler. El nivel de expresión de cada gen fue normalizado posteriormente al nivel de expresión de GAPDH (gen interno para la normalización de la cuantificación relativa) usando un método de curva estándar.

El ADNc obtenido de cada muestra se empleó como templado para la reacción de PCR. Se utilizó el “*kit GoTaq® qPCR Master Mix*” (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó los master mix en tubos eppendorf de 2ml de capacidad, mezclando los componentes del kit, sin incluir el ADNc, en el siguiente orden y concentración para un volumen final de 20 μ l por reacción:

- Agua libre de nucleasas 7.0 μ l x n
- 2 x MasterMix 12.5 μ l x n*
- *Primer Forward* (0.2 μ M) 0.25 μ l x n
- *Primer Reverse* (0.2 μ M) 0.25 μ l x n

*n = número de muestras a trabajar.

Se adicionó 5 μ l de ADNc (20 ng de ADNc) de cada una de las muestras, en los pocillos correspondientes. Finalmente los pocillos se introdujeron en el termociclador *Qtower 2.0/2.2 Real-Time PCR thermal Cycler* (analytkjena, Alemania) y se aplicó el siguiente protocolo: 95°C por 2 minutos y luego 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos, 57°C por 30

segundos y 72°C por 40 segundos, luego se programó la obtención de la temperatura de *melting* del producto (T_m) elevando la temperatura de 0.06°C desde 72°C a 90°C como temperatura final y luego se retiraron las muestras del termociclador, manteniéndolas a refrigeración a 4°C

Los resultados se visualizaron y analizaron con el programa *qPCRsoft* de *Analytikjena*, el cual nos brindó los valores del Ciclo Umbral (Ct) y las temperaturas de disociación o *Melting* (T_m) de los productos obtenidos.

3.3.2.e. Cuantificación Relativa.

Los datos obtenidos por la R_t – qPCR fueron empleados para la fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para la obtención de la cuantificación de la expresión relativa de genes detectables

3.4 Análisis de la información.

Este estudio es descriptivo, los resultados fueron expresados en porcentajes del total de muestras que resultaron positivas a la detección y expresión de las variantes de los receptores RAR α .

IV. RESULTADOS

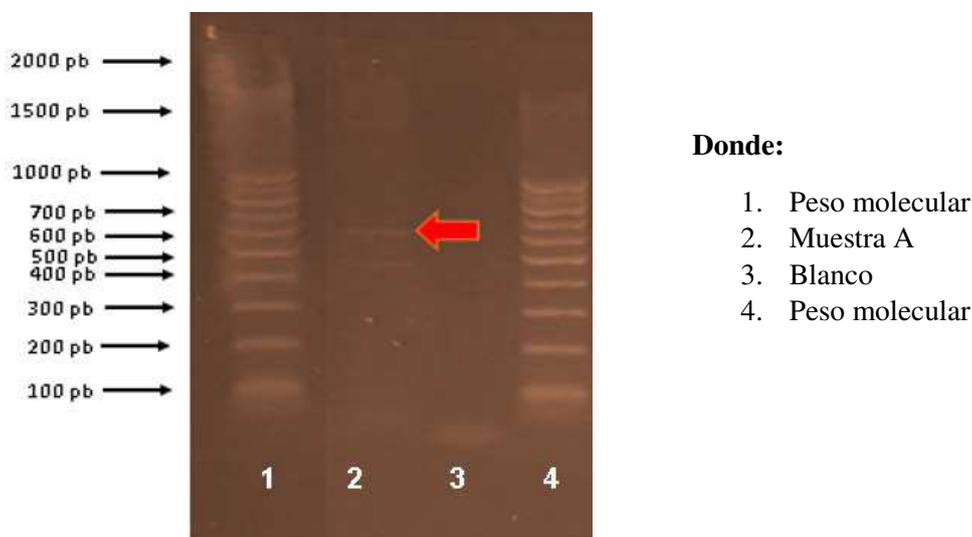
4.1. Análisis de diseño de *primers* para RAR α

Se analizaron los *primers* (*forward* y *reverse*) en el programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) y se determinó la especificidad de éstos (Anexos 2 y 3.) para las 4 variantes del receptor RAR α (X1, X2, X3 y X4).

4.2. Determinación de los genes de RAR α

Del ADN total de leucocitos de alpacas adultas trabajados con PCR convencional y los *primers* diseñados de la isoforma del receptor RAR α , se determinó la presencia del gen RAR α , utilizando los *primers* para secuenciamiento y observando un producto único de 626 pares de bases (pb) (Figura n°3) en el gel de agarosa (1.5%).

Figura N°3.- PCR convencional para el receptor RAR α con la utilización de *primers* de secuenciamiento. Se observa la presencia de bandas de 626 pares de bases (2).



4.3. Expresión del receptor RAR α en la mucosa yeyunal de crías de alpaca

4.3.1. Expresión del gen GAPDH (Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) con expresión constitutiva

Se evaluó la expresión del gen GAPDH usado como control endógeno en la cuantificación relativa, determinando la viabilidad de las muestras. Todas las muestras obtenidas, muestran una

curva de amplificación o Ct (Ciclo Umbral), en un rango de 27 a 37 (**Fig. 4**). La Tm (Temperatura de *melting* o disociación) de los productos de amplificación fue de 87 ± 1 (**Fig. 5**) siendo constante la Tm en todos los productos amplificados, dando como resultado la amplificación de un producto único y específico.

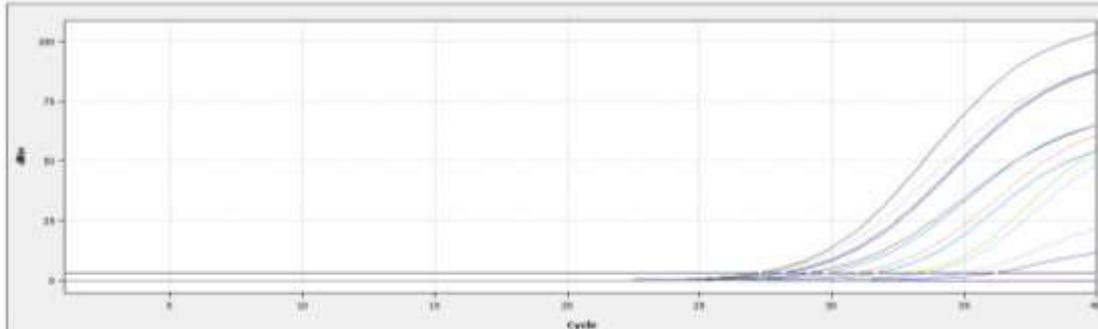


Fig. 4. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GAPDH en intestino de alpaca. Los productos tuvieron un Ct entre 27 a 37.

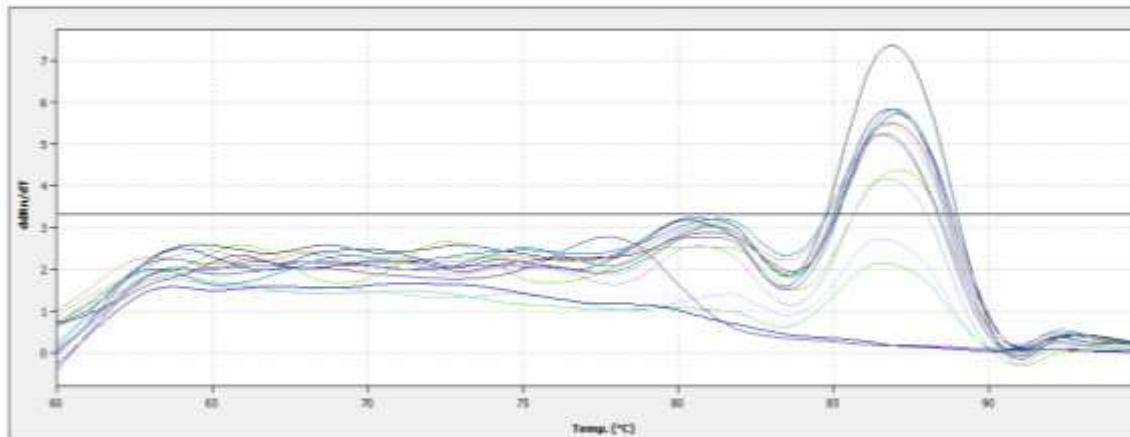


Figura 5. Curvas de disociación de los productos con el set de oligonucleótidos para el gen GAPDH en intestino de alpaca. La Tm tuvo un rango de $87\pm 1^\circ\text{C}$.

4.3.2. Expresión de receptores RAR α

4.3. 2.1. Expresión del receptor RAR α en RT- qPCR

Todas las muestras mostraron una Ct dentro de un rango de 23 a 25 lo cual determinó la expresión del receptor RAR α (**Fig. 6**). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm entre 81.7 y 82.3 (**Fig 7**), dando como resultado la amplificación de un producto único y específico.

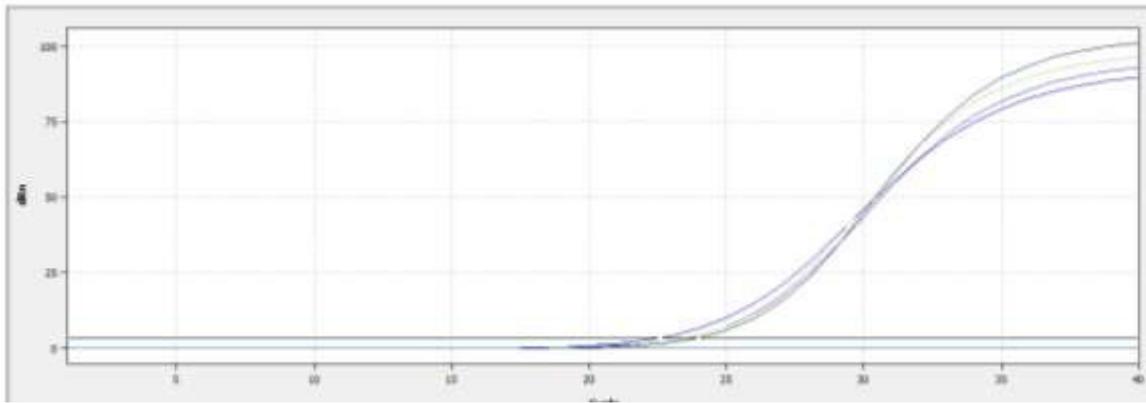


Fig. 6. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para RAR α en muestras de intestino de alpaca. Los productos mostraron una Ct entre 23 a 25.

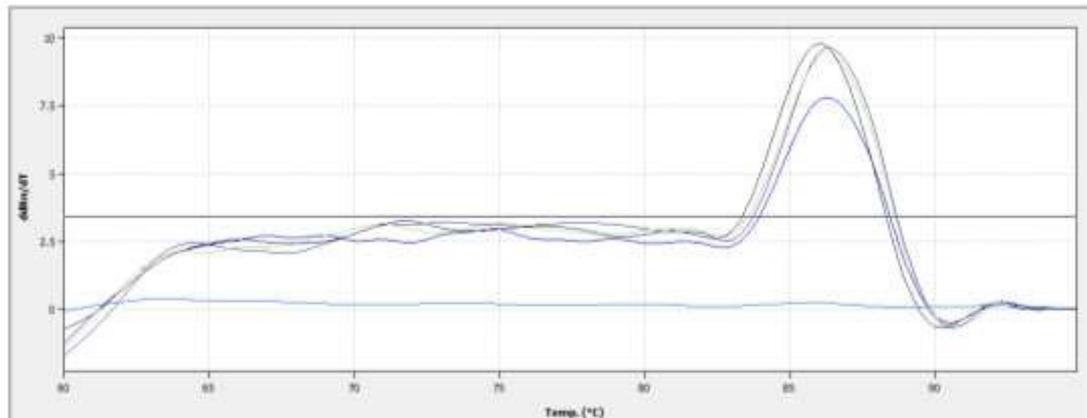
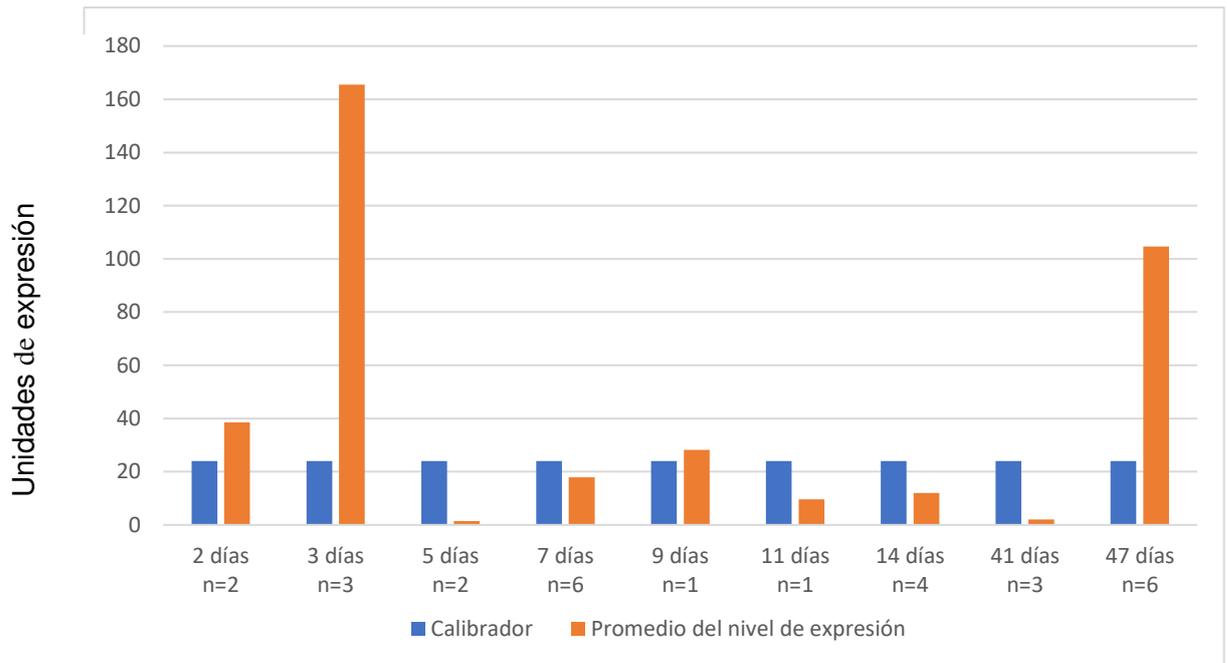


Fig. 7. Curvas de disociación (Tm) de los productos con el set de oligonucleótidos para el receptor RAR α en muestras de intestino de alpaca. Los valores de la Tm se presentaron dentro de un rango de $86 \pm 1^\circ\text{C}$

4.4. Cuantificación relativa de ARNm del receptor RAR α

Se empleó el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para comparar la expresión del ARNm del receptor RAR α en yeyuno de crías de alpacas de diferentes días de nacidos frente a un calibrador (muestras yeyunales de crías recién nacida sin consumo de calostro) y la expresión del gen endógeno GADPH de cada muestra. Los ciclos umbrales (Cts) obtenidos de cada muestra sirvieron para obtener la cuantificación relativa de la expresión de ARNm de los RAR α (ANEXO N° 4). Los niveles de expresión de los genes RAR α se mostraron mayor en yeyunos de animales de 2 y 3 días de edad (39 y 166 veces más que el calibrador, respectivamente) seguido de un descenso entre los 5 y 41 días; y un incremento en el día 47 (105 veces más que el calibrador) (Figura 8).



Edad expresada en días post nacimiento

Figura 8. Niveles de expresión promedio de ARNm de RAR α en mucosa yeyunal de crías de alpacas. Según análisis $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para la expresión de ARNm de RAR α en mucosa yeyunal de crías de alpaca según edad (días post - nacimiento).

V. DISCUSIÓN

Nuestro organismo se encuentra protegido por mecanismos de defensa específicos e inespecíficos los cuales conforman el sistema inmune, cuyas funciones involucran además de la protección, la vigilancia y mantenimiento de la homeostasis del organismo (Vega, 2007). En el presente estudio demostramos como un primer paso, la presencia del gen del receptor RAR α dentro del genoma de la alpaca (*Vicugna pacos*) y además, la expresión de este gen en la mucosa yeyunal de la especie, vinculando su presencia con la importancia biológica que cumple en el mantenimiento, modulación de la respuesta inmune y la homeostasis de los tejidos epiteliales y de mucosa, tal como se demostró en anteriores investigaciones (Cassani *et al.*, 2012).

El alineamiento de la secuencia de los *primers*, tanto *forward* (ANEXO N°2) y *reverse* (ANEXO N°3), del receptor RAR α , indica una elevada especificidad del 100% para las 4 variantes (X1, X2, X3 y X4) publicadas en el *GenBank* (NCBI, 2018). Los *primers* tuvieron un tamaño de 20 pares de bases, cumpliendo con los requerimientos para realizar una PCR con características estándar (Chou *et al.*, 1992) y su ubicación en el gen del receptor RAR α fue tomando en cuenta la región más conservada de éstas variantes; lo que se pudo evidenciar a través de los resultados de electroforesis, apreciándose en el gel de agarosa las bandas intensas que sugieren una gran cantidad de ARNm al inicio de la PCR.

Mediante la técnica de PCR convencional confirmamos la presencia el gen de RAR α en leucocitos sanguíneos, de acuerdo a lo planteado por Ávila *et al.* (2014) y Richardson *et al.* (2019). La presencia del amplificado en el gel de agarosa nos mostró un esperado de 626pb demostrando una alta especificidad al producto. Si bien es conocida la existencia del genoma completo de la alpaca (*Vicugna_pacos-2.0.1*) en la plataforma del *GenBank*, donde se predice el gen del RAR α , era necesario éste estudio realizado para comprobar su presencia.

Además de detectar el gen del RAR α en la mucosa yeyunal de las crías de alpaca, por la técnica de inmunohistoquímica, tal y como lo determinó Wang *et al.* (2019) en niños y ratones; la técnica de PCR nos permitió demostrar la viabilidad de los *primers* específicos diseñados para el secuenciamiento del receptor RAR α .

Los niveles de expresión de los genes RAR α se mostraron mayor en yeyunos de animales de 2 y 3 días de edad (39 y 166 veces más que el calibrador, respectivamente) seguido de un descenso entre los 5 y 41 días; y un incremento en el día 47 (105 veces más que el calibrador).

La alta expresión de éstos receptores en los primeros días de nacido se asocia a la transferencia placentaria de la vitamina A maternal hacia el feto. En humanos, ratones, ratas y monos se demostró que los retinoides atraviesan la barrera placentaria, además se sugiere que la placenta es un sitio de almacenamiento de la propia vitamina A hasta el desarrollo funcional del hígado (Spiegler *et al.*, 2011).

Una estimulación con ciertos niveles de vitamina A y carotenos presentes en el calostro, puede generar la expresión de los RAR α en los primeros días después del parto, ya que los seres vivos no sintetizan por sí mismos el ácido retinoico, si no que requieren de su consumo en la dieta diaria. La expresión de éstos receptores se va reduciendo durante los primeros 4 días, al disminuir la concentración de retinoides presentes; así como la implicancia de otros componentes del del calostro, como es la IgG (Möbller *et al.*, 2022).

Además, es importante mencionar que el sistema inmunológico de los recién nacidos presenta una respuesta de tipo humoral (Th2), con una escasa respuesta tipo celular (Th1), lo que previene reacciones de aloinmunidad durante la gestación (Dowling, 2014).

Mientras el neonato se desarrolla, aumenta la ingesta de forraje y de patógenos externos, lo que genera un constante reto para el sistema inmunológico, modificando tanto la estructura como la función de la mucosa entérica (Rosadio *et al.*, 2012); lo que se evidenció en anteriores estudios realizados en la mucosa intestinal de crías de alpaca, donde se expresa un incremento del TNF- α , IL-1 α (Bardález *et al.*, 2013), IL17 (Herrera, 2012), IgA (Dionisio *et al.*, 2014) y péptidos antimicrobianos (More *et al.*, 2011); en las primeras semanas de vida. Además, los mismos autores coinciden en una reducción paulatina de la expresión de éstas citoquinas y péptidos antimicrobianos entre la quinta y sexta semana de edad, sugiriendo la homeostasis y adaptación del sistema inmunológico al medio externo en ésta etapa de vida. La baja expresión de los receptores RAR α entre los 5 y 41 días de edad, corrobora el estudio realizado por Brown *et al.*, 2015, quienes demostraron una baja predominancia Th1 (inmunidad celular), y una alta expresión de los genes que regulan TH7 (IL17).

Burga (2017) estudió la cinética de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β , y concluyó el aumento gradual de su expresión con la edad, determinando picos de expresión entre los 26 y 47 días de vida (3era y 5ta semana) sugiriendo que su actividad antiinflamatoria regula la inmunidad innata y adquirida en ésta etapa. Así mismo, el incremento en la TGF- β , sumado a la estimulación progresiva de ácido retinoico por parte de la ingesta alimentaria de forraje, coestimulan la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$, que junto a CCR9 favorece el tropismo intestinal de los linfocitos T (Zhang y Bevan, 2013) (Hermeza *et al.*, 2018). Él presente trabajo demuestra la regulación por parte del receptor de ácido retinoico RAR α corroborando lo antes encontrado por Guo *et al.* (2014), evidenciando una mayor expresión en el día 47.

La especificidad de los productos amplificados del gen RAR α en las muestras de yeyuno se determinó mediante la Curva de *Melting* (T_m). La temperatura de disociación de los productos obtenidos denota una alta especificidad de la RT PCR. Los resultados indican que las muestras tienen un solo producto (un solo pico de disociación) y posee un T_m con un rango de 86±1°C. A pesar que los productos pueden ser de las 4 variantes de RAR α de alpaca predichas, éstas tienen un alto grado de conservación en tamaño y en secuencia. Los productos con una T_m con baja variabilidad indican un producto muy conservado, ya que esta T_m varía cuando se tienen diferentes secuencias o productos de distintos tamaños.

En alpacas, un inmunomodulador de la vitamina A, ha sido utilizado junto y como adyuvante de una vacuna oral contra *Clostridium perfringens*, donde Reyes *et al.* (2017) demostró el incremento de la producción de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- β . El gen RAR α expresado en el yeyuno de las crías de alpacas, junto a los estudios anteriormente mencionados, y los reportados en otras especies (Cassani *et al.*, 2012; Jijon HB *et al.*, 2019) evidencia la participación de este receptor en la respuesta inmune intestinal tanto innata como adaptativa; sin embargo, mayores estudios deben ser realizados para determinar los diferentes mecanismos e interacciones de dicho receptor con el AR y su implicancia en la respuesta inmune en las mucosas de los CSA.

VI. CONCLUSIONES

1. El gen del receptor $RAR\alpha$ se encuentra presente en alpacas.
2. El ARNm del receptor $RAR\alpha$ se expresa en la mucosa yeyunal de crías de alpaca.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con un mayor número de muestras y estratificar por edades, a fin de establecer una relación en cuanto a la edad y a la cuantificación relativa de los ARNm de RAR α en la mucosa yeyunal de las crías de alpaca.
- Realizar estudios donde se compare el nivel de expresión de los ARNm de los RAR en mucosa yeyunal de crías de alpaca de diferentes edades, con el fin de establecer alguna relación con la inmunidad maternal.
- Diseñar *primers* específicos para las otras isoformas RAR (γ y β) y determinar su expresión en la mucosa yeyunal de crías de alpaca.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008.** Inmunología celular y molecular. 6a ed. Madrid: Elsevier. 576p.
2. **Avila F, Baily MP, Perelman P, Das PJ, Pontius J, Chowdhary R. 2014.** A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). Cytogenet Genome Res 144: 196-207.
3. **Abumohor P. 2005.** Fisiología de la respuesta inmune. Reumatología 21: 51-57.
4. **Azais - Braesco V, Pascal G. 2000.** Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr* 71 (Suppl.5): 1325S – 1333S.
5. **Bardález C, Manchego S, Chiok C, Lam K, Sandoval C, More B, Pezo D, Ramírez V. 2013.** Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucina 1 alfa (IL-1 α) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. *Rev Inv Vet Perú* 24: 381- 389.
6. **Barreto ML, Santos LM, Assis AM, Araujo MP, Farenzena GG, Santos PA, Fiaccone RL. 1994.** Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory tract infections in young children in Brazil. *Lancet* 344: 228 –231.
7. **Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly JM, Chambon P, Rochette-Egly C. 2000.** TRIM24 interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* 275 (Suppl. 29): 21896–21904.
8. **Berard J, Gaboury L, Landers M. 1994.** Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR beta 4-like transgene. *Embo J* 13: 5570-80.
9. **Berry DC, Croniger CM, Ghyselinck NB, Noy N. 2012.** Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol - binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32 (Suppl.19): 3851–3859.
10. **Blomhoff R, Blomhoff HK .2006.** Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66 (Suppl.7): 606–630.
11. **Bono MR, Tejon G, Flores-Santibañez F, Fernandez D, Roseblatt M, Sauma D. 2016.** Retinoic Acid as a Modulator of T Cell Immunity. *Nutrients* 8 [Internet],[13 Junio 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924190/>

12. **Brown CC, Esterhazy D, Sarde A, London M, Pullabhatla V, Osma-Garcia I, Al-Bader R, Ortiz C, Elgueta R, Arno M, de Rinaldis E, Mucida D, Lord GM, Noelle RJ. 2015.** Retinoic acid is essential for Th1 cell lineage stability and prevents transition to a Th17 cell program. *Immunity* 42 (Suppl.3):499–511.
13. **Cassani B, Villablanca EJ, De Calisto J, Wang S, Mora JR. 2012.** Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Mol Aspects Med* 33(Suppl.1): 63–76.
14. **Chiok KL. 2012.** Expresión de citoquinas de las respuestas Th1 (IFN- γ e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis para optar por el grado académico de magister en ciencias veterinarias con mención en salud animal. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 126p.
15. **Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. 1992.** Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 20: 1717–1723.
16. **Colonna M, Pulendran B, Iwasaki A. 2006.** Dendritic cell at the host-pathogen interface. *Nature Immunology* 6 (Suppl.2): 117-120.
17. **Dawson HD, Li NQ, Deciccio KL, Nibert JA, Ross AC. 1999.** Chronic marginal vitamin A status reduces natural killer cell number and activity and function in aging Lewis rats. *J Nutr* 129: 1510 – 1517.
18. **Dionisio CJ, Manchego SA, Chiok KL, Sandoval CN, More BJ, Pezo CD, Rivera GH. 2014.** Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Vet Perú* 25 (Suppl.2): 151-161.
19. **Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. 1999.** Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol Chem* 274 :23695–23698.
20. **Erkelens MN, Mebius RE. 2017.** Retinoic acid and immune homeostasis :abalancing act. *Trends Immunology* 38 (Suppl.3): 168-180.
21. **Evans R. 2004.** A transcriptional basis for physiology 1. *Nat Med* 10 (Suppl.10):1022–1026.
22. **FAO. 2017.** Lima: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. [Internet], [Abril 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ms793S.pdf>
23. **Favre L, Spertini F, Corthés B. 2005.** Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J Immunol* 175: 2793-2800.

24. **Gatuua S, Bang YJ, Pendse M, Dende C, Chara AL, Harris TA, Wang Y, Ruhn KA, Kuang Z, Sockanathan S, Hooper LV. 2019.** Epithelial retinoic acid receptor β regulates serum amyloid A expression and vitamin A-dependent intestinal immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 116 (Suppl. 22): 10911–10916.
25. **Gentry A, Clutton-Brock J, Groves CP. 2004.** The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *J Scienc* 31: 645-651.
26. **Germain P. 2006.** International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58 (Suppl.4):712–725.
27. **Guerra.2015.** Falla de transferencia pasiva de inmunoglobulina G y su asociación con mortalidad por enterotoxemia en alpacas neonatas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac. Mayor de San Marcos. 80p.
28. **Guo Y, Lee YC, Brown C, Zhang W, Usherwood E, Noelle RJ. 2014.** Dissecting the role of retinoic acid receptor isoforms in the CD8 response to infection. *J Immunol.* 192:3336–3344.
29. **Hall JA, Cannons JL, Grainger JR, Dos Santos LM, Hand TW, Naik S, Wohlfert EA, Chou DB, Oldenhove G, Robinson M. 2011.** Essential Role for Retinoic Acid in the Promotion of CD4+ T cell Effector Responses via Retinoic Acid Receptor Alpha. *Immunity* 34:435–447.
30. **Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. 2011.** The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 35 (Suppl.1): 13-22.
31. **Harrison EH. 2005.** Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25:87–103.
32. **Harrison EH. 2012.** Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and pro vitamin A carotenoids. *Biochim. Biophys Acta* 1821:70–77.
33. **Hermeza E, Manchego A, Castro G, Pezo D, Sandoval N. 2018.** Efecto del ácido retinoico sobre la expresión del receptor CCR9 y la integrina alfa 4 beta 7 en leucocitos sanguíneos de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev. investig. vet. Perú* 29(1): 349-361.
34. **Hernández M, Alvarado A. 2001.** Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 12: 272-280.
35. **Hjertson M, Kivinen PK, Dimberg L, Nilsson K, Harvima IT, Nilsson G. 2003.** Retinoic acid inhibits the in vitro development of mast cells, but does not have a marked effect on

- the mast cells positive for tryptase and chymase of mature human skin. *J Invest Dermatol* 120 (Suppl.2): 239–245.
36. **Jijon HB, Suárez LL, Diaz OE, Das S, De Calisto J, Parada KM, Taffe MB, Pittet MJ, Mora JR, Belkaid Y, Xavier RJ, Villablanca EJ. 2018.** Intestinal epithelial cell-specific RAR α depletion results in aberrant epithelial cell homeostasis and underdeveloped immune system. *Mucosal Immunol* 11: 703–715.
 37. **Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P. 1989.** A third human retinoic acid receptor, hRARc. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5310–5314.
 38. **Kim M, Taparowsky EJ, Kim CH. 2015.** Retinoic Acid Differentially Regulates The Migration Of Innate Lymphoid Cell Subsets To The Gut. *Immunity* 43:107–119.
 39. **Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M, Chambon P. 1993.** Function of retinoic acid receptor c in the mouse. *Cell* 73:643–658.
 40. **Kin Ting Kam R., Deng Y, Chen Y. 2012.** Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Cell & Bioscience* 2 [Internet], [22 march 2012]. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/3067126>
 41. **Marshall S, Arenas G. 2003.** Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic J Biotech.* 6: 271-285.
 42. **Mayer L. 2003.** Mucosal Inmun. *Pediatrics* 111: 1595 – 1600.
 43. **Mendonça L, Emidio FM, Sato MN. 2018.** Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation* [Internet], [9 august 2018]. Disponible en: <http://www.cellandbioscience.com/content/2/1/11>
 44. **Mößler M, Rychli K, Reichmann V, Albert T, Wittek T. 2022.** Immunoglobulin G Concentrations in Alpaca Colostrum during the First Four Days after Parturition. *Animals (Basel)*. 12(2):167p.
 45. **Mora J.R., von Andrian U.H. 2008.** Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol* 1:96–109.
 46. **More J. 2010.** Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (α y β defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 83 p.
 47. **Oppenheim J, Biragyn A, Kwak L, Yang D. 2003.** Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptative immunity. *Ann. Rheum. Dis* 62: 17-21.

48. **Portal Agrario. 2015.** Lima: Ministerio de Agricultura y Riego. [Internet], [Julio 2015]. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/especial-iv-cenagro/495-dn-alpaca/11180-p-alpaca>.
49. **Ramakrishnan U, Web AL, Ologoudou K. 2004.** Infection, immunity, and Vitamins. In Handbook of Nutrition and Immunity. 1ª ed. New York: Gershwint, M. Eric, Penelope, Keen, Carl L P Nestel. 365p.
50. **Ramiro-Puig E, Pérez F, Catellote C, Franch A, Castell M. 2008.** El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev esp Enferm Dig* 100 (Suppl.1): 29-34.
51. **Reyes J, Manchego A, Castro G, Burga C, Pezo D, Sandoval N, Ramírez M, Rivera H. 2017.** Expresión de los Genes de Inmunoglobulina A y Citoquinas Asociadas IL-5, IL-6 y TGF- β en Mucosa Intestinal de Crías de Alpacas (*Vicugna pacos*) vacunadas con Antígeno clostridial. *Rev Inv Vet Perú* 28 (Suppl.3): 703-712.
52. **Richardson MF, Munyard K, Crot LJ, Allnutt TR, Jackling f, Alshanbari f, Jevit M, Wright GA, Cransberg R, Tibary A, Perelman P, Appleton B, Raudsepp T. 2019.** Chromosome-Level Alpaca Reference Genome VicPac3.1 Improves Genomic Insight Into the Biology of New World Camelids. *Front Genet* 10:586.
53. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna E. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 261-271.
54. **Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly JM, Chambon P. 2009.** Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90:97– 107.
55. **Salazar S, Chávez M, Delgado X, Pacheco T, Rubio E. 2009.** Lactancia materna. *Arco Venez Puer Ped* 72 (Suppl.4):163-166.
56. **Semba RD. 1999.** Vitamin A as “anti-infective” therapy, 1920–1940. *J Nutr* 129:783–91.
57. **Schuster GU, Kenyon NJ, Stephensen CB. 2008.** Vitamin A deficiency decreases and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma. *J Immunol* 180: 1834-1842.
58. **Sommer A, Katz J, Tarwotjo I. 1984.** Increased risk of respiratory disease and diarrhea in children with preexisting mild vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 40: 1090– 1095.
59. **Spiegler E, Kim Y, Wassef L, Shete V, Quadro L. 2011.** Maternal-fetal transfer and metabolism of vitamin A and its precursor α -carotene in the developing tissues. *Acta Biochim Biophys* 182(1):88–98.

60. **Sun CM, Hall JA, Blank RB. 2007.** Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204 (Suppl.8):1775–1785.
61. **Surman SL, Jones BG, Sealy RE, Rudraraju R, Hurwitz JL. 2014.** Oral retinyl palmitate or retinoic acid corrects mucosal IgA responses toward an intranasal influenza virus vaccine in vitamin a deficient mice. *Vaccine* 32(Suppl.22):2521–2524.
62. **Tejón G, Manríquez V, De Calisto J, Flores-Santibañez, Hidalgo Y, Crisóstomo N, Fernandez D, Sauma D, Mora JR, Bono MR, Roseblatt M. 2015.** Vitamin A impairs the reprogramming of Tregs into IL-17-producing cells during intestinal inflammation. *Biomed Res Int*: 127893.
63. **Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. 2010.** From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1423–45.
64. **Tizard IR. 2009.** Introducción a la inmunología veterinaria. 8ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders. 574 p.
65. **Vega MA. 2007.** Inmunología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. *Cinvestav* 26(Suppl.1): 55-59.
66. **García M, Guerrero G, Castro M, Medina de La Garza E. 2009.** Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Elsevier* 45 (Suppl.11):247-259.
67. **Wang Z, Wang Q, Gu C, Zhang J, Wang Y. 2019.** Abnormal serum vitamin A levels and α retinoic acid receptor expression patterns in children with anorectal malformation. *Pediatr Sug Int* 35 (Suppl.8): 903-910.
68. **Weinberg A, Keisanaprakorkit S, Dale B. 1998.** Epithelial antimicrobial peptides: Review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 9 (Suppl.4): 399 – 414.
69. **Yuan Q, Walker W. 2004.** Innate immunity of gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38(Suppl.5): 463-473.
70. **Zhang N, Bevan M. 2013.** Transforming growth factor- β signaling controls the formation and maintenance of gut resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity.* 39 (Suppl.4): 687-696.
71. **Zaiger G, Nur T, Barshack I, Berkovich Z, Goldberg I, Reifen R. 2004.** Vitamin A exerts its activity at the transcriptional level in the small intestine. *Eur J Nutr* 43 (Suppl.5): 259–266.

72. Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, Krust A, Garnier JM, Ruffenach F, Leroy P, Chambon P. 1991. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *Embo J* 10: 71-81.

IX. ANEXOS

Anexo N° 1: Código de identificación de cada animal y edad en días de las crías de alpaca.

IDENTIFICACIÓN	EDAD
Vpac 04	0 días
Vpac 05	0 días
Vpac 06	0 días
ALP01	2 días
ALP02	3 días
ALP03	3 días
ALP04	3 días
ALP05	15 días
ALP06	14 días
ALP07	14 días
ALP08	7 días
ALP09	41 días
ALP10	47 días
ALP11	38 días
ALP12	47 días
ALP13	39 días
ALP14	14 días
ALP15	20 días
ALP16	9 días
ALP17	9 días
ALP18	11 días
ALP19	35 días
ALP20	5 días
ALP21	7 días
ALP22	8 días
ALP23	10 días
ALP24	13 días
ALP25	26 días
ALP26	14 días
ALP27	19 días
ALP28	20 días

ALP29	25 días
ALP30	40 días

Reseña: V_{pac} = Calibrador o alpaca recién nacida (0 días)

Anexo N.2. Alineamiento de los *primers Forward* para la evaluación de RAR α en intestino de alpaca

BLAST Results

Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

[Edit and Resubmit](#) [View Search Strategies](#) [Exporting options](#) [Download](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#) **NEW** [Click here to use the new BLAST results page](#)

Blast 2 sequences

Job title: RAR α alpacas

RID: [E9636278114](#) (Expires on 09-28 01:35 am)

Query ID: [tblQuery_55378](#) **Subject ID:** 8 subjects

Description: RAR α alpacas **Description:** [See details](#)

Molecule type: nucleic acid **Molecule type:** nucleic acid

Query Length: 20 **Subject Length:** 18997 **Program:** BLASTN 2.9.0+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Distance from results](#) [MGA viewer](#)

NEW Designing or Testing PCR Primers? Try your search in [Primer-BLAST](#) [Go](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 27 Blast Hits on 8 subject sequences [Go](#)
 Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

■ <40 ■ 40-80 ■ 80-100 ■ 100-200 ■ >=200

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [Go Back](#) [Graphics](#) [Distance from results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, alpha (RARα), transcript variant X4, mRNA	40.1	68.9	100%	2e-07	100.00%	NM_015247923.1
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, alpha (RARα), transcript variant X1, mRNA	40.1	83.2	100%	2e-07	100.00%	NM_006214276.2
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, alpha (RARα), transcript variant X2, mRNA	40.1	83.2	100%	2e-07	100.00%	NM_006214275.2
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, alpha (RARα), transcript variant X3, mRNA	40.1	83.2	100%	2e-07	100.00%	NM_015247922.1
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, beta (RARβ), transcript variant X1, mRNA	20.3	65.4	100%	0.16	88.89%	NM_006201318.2
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, beta (RARβ), transcript variant X2, mRNA	20.3	65.4	100%	0.16	88.89%	NM_006201319.2
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, gamma (RARγ), transcript variant X1, mRNA	18.3	32.7	80%	0.63	100.00%	NM_006201038.2
PREDICTED: Vicuana pacos retinoic acid receptor, gamma (RARγ), transcript variant X2, mRNA	18.3	32.7	80%	0.63	100.00%	NM_006201039.2

NEW Designing or Testing PCR Primers? Try your search in [Primer-BLAST](#) [Go](#)

Alignments

Anexo 3. Alineamiento de los *primers* revers para la evaluación de RAR α en intestino de alpaca

BLAST Results

Your search parameters were adjusted to search for a short ligat sequence.
[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [View](#) [How to read this page](#) [BLAST report description](#) **NEW** [Click here to use the new BLAST results page](#)
 Blast 2 sequences

Job title: RAR α rev alpacas

RID: [F88C0601113](#) (Expires on 08-08 01:40 am)
 Query ID: [slQuery_91296](#)
 Description: RAR α rev alpacas
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 20

Subject ID: 8 subjects
 Description: [View details](#)
 Molecule type: nucleic acid
 Subject Length: 10997
 Program: BLASTN 2.9.0+ [View Citation](#)

Other reports: [Search Summary \(Distance tree of results\)](#) [MISA viewer](#)

NEW Designing or Testing PCR Primers? Try your search in [Primer-BLAST](#) [\(beta\)](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 10 Blast-Hits on 8 subject sequences [View](#)
 Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

■ <40	■ 40-50	■ 50-80	■ 90-200	■ >=200
-------	---------	---------	----------	---------

Descriptions [Questions/comments](#)

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments: [View](#) [Download](#) [Statistics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	Per. Ident	Accession
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	40.1	54.5	100%	2e-07	100.00%	XM_015247322.1
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	40.1	60.9	100%	2e-07	100.00%	XM_009214279.2
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	40.1	54.5	100%	2e-07	100.00%	XM_009214278.2
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	40.1	54.5	100%	2e-07	100.00%	XM_015247322.1
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	18.3	32.7	45%	0.63	100.00%	XM_009202038.2
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	18.3	47.1	60%	0.63	100.00%	XM_009202039.2
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	16.4	16.4	40%	2.5	100.00%	XM_009202039.2
PREDICTED: Musca domestica ribonuclease H1, cytosolic, mRNA	16.4	45.1	80%	2.5	100.00%	XM_009202039.2

NEW Designing or Testing PCR Primers? Try your search in [Primer-BLAST](#) [\(beta\)](#)

ANEXO 4. Resultados de la cuantificación relativa del ARNm de los receptores de RAR α en la mucosa yeyunal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) con respecto al calibrador

Muestras	CT1	CT2	CT X	Ct RARα de la muestra	Ct GAPDH	Ct RARα del Calibrador	Ct GAPDH	Resta	2⁻($\Delta\Delta$ct)	Edad (días)
alp01	22.5800	23.4200	23.0000	23.0000	31.4000	23.9900	27.12	-5.27	38.59	2
alp02	22.5000	20.9000	21.7000	21.7000	33.1400	23.9900	27.12	-8.31	317.37	3
alp03	22.5700	23.4300	23.0000	23.0000	31.4000	23.9900	27.12	-5.27	38.59	2
alp04	22.6400	22.5000	22.5700	22.5700	28.4000	23.9900	27.12	-2.70	6.50	3
alp05	23.4800	23.9800	23.7300	23.7300	30.4600	23.9900	27.12	-3.60	12.13	14
alp06	23.4700	23.9800	23.7250	23.7250	30.4600	23.9900	27.12	-3.61	12.17	14
alp07	22.7800	21.9900	22.3850	22.3850	29.0900	23.9900	27.12	-3.58	11.92	14
alp08	26.9800	27.1200	27.0500	27.0500	34.1900	23.9900	27.12	-4.01	16.11	7
alp09	24.1900	25.7400	24.9650	24.9650	29.0600	23.9900	27.12	-0.96	1.95	41
alp10	22.1300	22.1300	22.1300	22.1300	31.9700	23.9900	27.12	-6.71	104.69	47
alp11	22.1200	22.1300	22.1250	22.1250	31.9700	23.9900	27.12	-6.72	105.05	47
alp12	24.1800	25.7300	24.9550	24.9550	29.0600	23.9900	27.12	-0.97	1.97	41
alp13	21.7800	21.6700	21.7250	21.7250	29.3500	23.9900	27.12	-4.50	22.55	7
alp14	24.8000	24.9800	24.8900	24.8900	31.2800	23.9900	27.12	-3.26	9.58	11
alp15	26.8000	26.4700	26.6350	26.6350	30.1000	23.9900	27.12	-0.33	1.26	5
alp16	22.6500	22.5000	22.5750	22.5750	33.1400	23.9900	27.12	-7.44	173.04	3
alp17	26.9000	26.4700	26.6850	26.6850	30.1000	23.9900	27.12	-0.29	1.22	7
alp18	24.9800	24.8000	24.8900	24.8900	31.2800	23.9900	27.12	-3.26	9.58	11
alp19	22.1200	22.1400	22.1300	22.1300	31.9700	23.9900	27.12	-6.71	104.69	47
alp20	26.2500	26.2600	26.2550	26.2550	30.1100	23.9900	27.12	-0.72	1.65	5
alp21	21.7900	21.6800	21.7350	21.7350	29.3500	23.9900	27.12	-4.49	22.39	7
alp22	22.7900	21.9800	22.3850	22.3850	29.0900	23.9900	27.12	-3.58	11.92	14

alp23	21.7900	21.6700	21.7300	21.7300	29.3500	23.9900	27.12	-4.49	22.47	7
alp24	22.1300	22.1300	22.1300	22.1300	31.9700	23.9900	27.12	-6.71	104.69	47
alp25	21.8000	21.6600	21.7300	21.7300	29.3500	23.9900	27.12	-4.49	22.47	7
alp26	23.4600	23.9800	23.7200	23.7200	30.4600	23.9900	27.12	-3.61	12.21	14
alp27	22.1100	22.1500	22.1300	22.1300	31.9700	23.9900	27.12	-6.71	104.69	47
alp28	26.2200	26.2600	26.2400	26.2400	34.1900	23.9900	27.12	-4.82	28.25	9
alp29	22.1200	22.1500	22.1350	22.1350	31.9700	23.9900	27.12	-6.70	104.33	47
alp30	24.1800	25.7200	24.9500	24.9500	29.3500	23.9900	27.12	-1.27	2.41	41
