

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Determinación de la expresión de los genes de IgA y  
citoquinas asociadas IL-5, IL-6 Y TGF-B en mucosa  
intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*)  
vacunadas con antígeno clostridial**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Joan Manuel Reyes Zelayarán

**ASESOR**

Alberto Manchego Sayán

Lima - Perú

2015



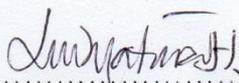
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

## Facultad de Medicina Veterinaria

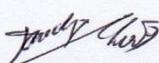
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

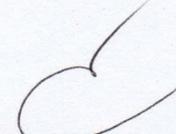
Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 176-EAPMV/FMV-2015

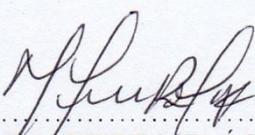
PRESIDENTE :

  
.....  
ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ

MIEMBROS :

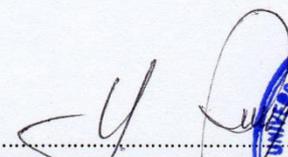
  
.....  
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN  
Asesor de la Tesis

  
.....  
BORIS ANTONIO LIRA MEJÍA

  
.....  
MERCY RAMIREZ VELÁSQUEZ

San Borja, 15 de diciembre de 2015

V° B°

  
.....  
MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERONIMO  
Directora de la Escuela Académico 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 15 de diciembre de 2015**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **176-EAPMV/FMV-2015**, integrado por los siguientes profesores:

<b>ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ</b>	Presidente del Jurado
<b>ALBERTO MANCHEGO SAYÁN</b>	Asesor de la Tesis
<b>BORIS ANTONIO LIRA MEJÍA</b>	Miembro del Jurado
<b>MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ</b>	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **REYES ZELAYARÁN, JOAN MANUEL**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE IgA Y CITOQUINAS ASOCIADAS IL-5, IL-6 Y TGF- $\beta$  EN MUCOSA INTESTINAL DE CRÍAS DE ALPACAS (Vicugna pacos) VACUNADAS CON ANTÍGENO CLOSTRIDIAL”**

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 **DIECIOCHO ( 18 )**.

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

Siendo las **13:45 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:

Abelardo Maturrano Hernández: PhD. Prof. Asociado, T.C.

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

Boris Antonio Lira Mejía: Mg. Prof. Asociado, T.C.

Mercy Ramírez Velásquez: Mg. Prof. Auxiliar, D.E.



## **DEDICATORIA**

A mis padres Fanny y Manuel que son ejemplos de perseverancia y constancia perfectamente mantenido a través del tiempo, por darme de su amor, apoyo incondicional, educación, valores y la motivación constante a seguir adelante.

A mis hermanos David y Uriel quienes cada día van progresando en la vida y me brindan de su cariño y alegría constante compartiendo los mejores consejos, anécdotas y risas en el calor de hogar.

A Jessica y mis grandes amigos quienes fueron un gran soporte emocional y apoyo mutuo en nuestra formación profesional, de ustedes guardo los mejores momentos de la vida universitaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor de tesis, el Dr. Alberto Manchego, por brindarme la oportunidad de formar parte de su excelente grupo de investigación del cual me siento agradecido, así mismo de los buenos consejos que aprendí de usted para crecer profesionalmente.

A Gina Castro por ser una gran persona y gestora en la ejecución del presente estudio, por su colaboración y horas dedicadas, explicaciones, recomendaciones y sobre todo por su amistad.

A los doctores Hermelinda Rivera, Mercy Ramírez, Nieves Sandoval y Danilo Pezo por ser una gran fuente de conocimientos, ideas y sugerencias, y grandes ejemplos a seguir.

A mis compañeros de laboratorio Ana, Denis, Cesar, Raquel, Eduardo y Vicente por el gran apoyo, motivación, consejos y recomendaciones brindadas durante la realización del presente trabajo.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Proyecto N°180 FINCyT-IB 2013) por brindar el financiamiento para la elaboración del presente estudio.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE CUADROS	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Camélidos sudamericanos	3
2.2. La alpaca	4
2.2.1. Importancia económica	4
2.2.2. Mortalidad neonatal	5
2.3. Enterotoxemia	5
2.3.1. Etiología: <i>Clostridium perfringens</i>	7
2.3.2. Patogenie	9
2.3.3. Signos clínicos	9
2.3.4. Lesiones anatomopatológicas	10
2.3.5. Diagnóstico	11
2.3.6. Control y prevención	11
2.4. Sistema inmune	12
2.4.1. Inmunidad pasiva	13
2.4.2. Inmunidad innata	13
2.4.3. Inmunidad de mucosas	14
2.4.4. Inmunidad adaptativa	17
2.4.4.1. Inmunoglobulinas	18
2.4.4.2. Inmunoglobulina A	19
2.4.4.3. Citoquinas	20
2.4.4.4. Interleucina 5	21
2.4.4.5. Interleucina 6	22
2.4.4.6. Factor de crecimiento transformante $\beta$	23
2.4.5. Vacunación de superficies mucosas	24

2.5.	Reacción en cadena de la polimerasa	25
2.5.1.	Componentes	26
2.5.2.	Pasos	27
2.5.3.	PCR en tiempo real	28
2.6.	Cuantificación relativa	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1.	Lugar de estudio	30
3.2.	Preparación de antígeno clostridial	30
3.3.	Animales para el estudio	31
3.4.	Protocolo de administración	31
3.5.	Toma de muestra	31
3.6.	Extracción de ARN total	32
3.7.	Cuantificación de ARN total	33
3.8.	Electroforesis de ARN total	33
3.9.	Síntesis de ADN complementario por RT-PCR	34
3.10.	PCR en tiempo real	34
3.11.	Cuantificación relativa	36
3.12.	Análisis estadístico	37
IV.	RESULTADOS	38
4.1.	Electroforesis de ARN total extraído	38
4.2.	RT-PCR en tiempo real del ARNm de GAPDH	38
4.3.	RT-PCR en tiempo real del ARNm de IL-5	39
4.4.	RT-PCR en tiempo real del ARNm de IL-6	39
4.5.	RT-PCR en tiempo real del ARNm de TGF- $\beta$	39
4.6.	RT-PCR en tiempo real del ARNm de IgA	40
4.7.	Cuantificación relativa del ARNm del gen IL-5	40
4.8.	Cuantificación relativa del ARNm del gen IL-6	42
4.9.	Cuantificación relativa del ARNm del gen TGF- $\beta$	44
4.10.	Cuantificación relativa del ARNm del gen IgA	46
V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIONES	57
VII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	58
VIII.	APÉNDICE	65

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar y comparar los niveles de expresión de los genes de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  en la mucosa intestinal de crías de alpaca clínicamente sanas, las cuales recibieron una vacuna oral de antígeno clostridial en dos dosis. Como control se utilizaron crías que no recibieron la vacuna (n=10). Los animales vacunados (n=15) recibieron la primera dosis entre los días 1 y 40 de edad, y la segunda 7 días después, para realizar el muestreo 7 días post-segunda dosis. Al momento de la toma de muestra se dividieron en dos subgrupos por edad: el primero de 15 a 28 días y el segundo de 35 a 56 días. Se tomaron segmentos intestinales de 2 cm de longitud de la porción media del yeyuno y se almacenaron en congelación a -196°C hasta su procesamiento. Se realizó la extracción de ARN total y luego se sintetizó el ADN complementario (ADNc) por transcripción inversa. Posteriormente se realizó la PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos diseñados para IL-5, IL-6, TGF- $\beta$  y el exón 3 de IgA. Se realizó la evaluación de la expresión relativa mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los resultados demostraron que las crías vacunadas con antígeno clostridial tuvieron una mayor expresión de IgA (control 275.3 veces y vacunados 710.2 veces más que el calibrador) con un nivel de significancia  $p=0.0055$ . Las crías vacunadas del primer subgrupo expresaron IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  en 1.96, 4.78 y 2.87 veces más que el calibrador respectivamente, observándose diferencia significativa con el grupo control. Por lo tanto, se concluye que la administración de antígeno clostridial como vacuna oral en crías de alpaca en los primeros catorce días de edad promueve una mayor expresión de los genes de IgA, IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  a nivel de mucosa intestinal.

**Palabras claves:** crías de alpaca, antígeno clostridial, inmunoglobulina A, RT-PCR en tiempo real, cuantificación relativa.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to determine and compare the expression levels of genes of IgA and associated cytokines IL-5, IL-6 and TGF- $\beta$  in the intestinal mucosa of clinically healthy baby alpaca, which they received an oral vaccine of clostridial antigen in two doses. As a control were used baby who not received the vaccine (n=10). Vaccinated animals (n=15) received the first dose between 1 and 40 days old, and the second 7 days after, for sampling 7 days post-second dose. At the moment of sampling they were divided into two subgroups by age: the first of 15 to 28 days and the second from 35 to 56 days. They were taken intestinal segments of 2 cm length of the middle portion of the jejunum and stored frozen at -196C until processing. It has been made total RNA extraction and after it was synthesized the complementary DNA (cDNA) by reverse transcription. Subsequently it takes real-time PCR using specific primers designed to IL-5, IL-6, TGF- $\beta$  and exon 3 of IgA. Evaluating relative expression was performed using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. The results showed that babies vaccinated with clostridial antigen they had greater expression of IgA (control 275.3 times and vaccinated 710.2 times the calibrator) with a significance level of  $p=0.0055$ . The vaccinated babies of the first subgroup expressed IL-5, IL-6 and TGF- $\beta$  in 1.96, 4.78 and 2.87 times the calibrator respectively, observed significant difference with the control group. Therefore, it is concluded that administration of clostridial antigen as an oral vaccine in babies alpaca the first fourteen days old promotes greater expression of genes IgA, IL-5, IL-6 and TGF- $\beta$  to intestinal mucosa level.

**Key words:** baby alpaca, clostridial antigen, immunoglobulin A, real-time RT-PCR, relative quantification.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 56 días). .....	41
<b>Figura 2.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 28 días). .....	41
<b>Figura 3.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (35 a 56 días). .....	42
<b>Figura 4.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 56 días). .....	43
<b>Figura 5.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 28 días). .....	43
<b>Figura 6.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (35 a 56 días). .....	44
<b>Figura 7.</b> Cuantificación relativa del ARNm de TGF- $\beta$ en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 56 días). .....	45
<b>Figura 8.</b> Cuantificación relativa del ARNm de TGF- $\beta$ en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 28 días). .....	45
<b>Figura 9.</b> Cuantificación relativa del ARNm de TGF- $\beta$ en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (35 a 56 días). .....	46
<b>Figura 10.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 56 días). .....	47
<b>Figura 11.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (15 a 28 días). .....	47
<b>Figura 12.</b> Cuantificación relativa del ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas (35 a 56 días). .....	48

<b>Figura A-1.</b> Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% del ARN total extraído para visualizar el ARN ribosomal 28S y 18S. ....	65
<b>Figura A-2.</b> Curvas de disociación (Tm) para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas. ....	65
<b>Figura A-3.</b> Curvas de disociación (Tm) para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas. ....	65
<b>Figura A-4.</b> Curvas de disociación (Tm) para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas. ....	66
<b>Figura A-5.</b> Curvas de disociación (Tm) para TGF- $\beta$ en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas. ....	66
<b>Figura A-6.</b> Curvas de disociación (Tm) para el exón 3 de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas. ....	66
<b>Figura A-7.</b> Curvas de amplificación (Ct) para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas. ....	67
<b>Figura A-8.</b> Curvas de amplificación (Ct) para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas (no vacunadas). ....	67
<b>Figura A-9.</b> Curvas de amplificación (Ct) para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas (vacunadas). ....	67
<b>Figura A-10.</b> Curvas de amplificación (Ct) para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas (no vacunadas). ....	68
<b>Figura A-11.</b> Curvas de amplificación (Ct) para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas (vacunadas). ....	68
<b>Figura A-12.</b> Curvas de amplificación (Ct) para TGF- $\beta$ en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas (no vacunadas). ....	68
<b>Figura A-13.</b> Curvas de amplificación (Ct) para TGF- $\beta$ en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas (vacunadas). ....	69
<b>Figura A-14.</b> Curvas de amplificación (Ct) para el exón 3 de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas (no vacunadas). ....	69
<b>Figura A-15.</b> Curvas de amplificación (Ct) para el exón 3 de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas (vacunadas). ....	69

## LISTA DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1:</b> Cebadores específicos diseñados para el gen del exón 3 de la IgA, IL-5, IL-6, TGF- $\beta$ y GAPDH. ....	35
<b>Cuadro I:</b> Temperatura de disociación de RT-PCR en tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas utilizando los cebadores para GAPDH, IL-5, IL-6, TGF- $\beta$ y el exón 3 de IgA. ....	70
<b>Cuadro II:</b> Resultados de la cuantificación relativa del ARNm de IL-5 de mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas con respecto al calibrador. ....	71
<b>Cuadro III:</b> Resultados de la cuantificación relativa de ARNm de IL-6 de mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas con respecto al calibrador. ....	72
<b>Cuadro IV:</b> Resultados de la cuantificación relativa de ARNm de TGF- $\beta$ de mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas con respecto al calibrador. ....	73
<b>Cuadro V:</b> Resultados de la cuantificación relativa del ARNm de IgA de mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas con respecto al calibrador. ....	74

## I. INTRODUCCIÓN

El principal medio de subsistencia de las comunidades del altiplano andino, radica en la crianza de alpacas, la cual se realiza de manera deficiente desde el punto de vista técnico y sanitario, factores que contribuyen a la gran mortalidad (que puede llegar al 85%) de las crías, siendo la enterotoxemia la enfermedad infecciosa más importante. Esta se origina a nivel intestinal por la proliferación de *Clostridium perfringens*, y cuya presentación demandaría el uso de antibióticos desencadenando gastos y pérdidas de animales (Bustinza, 2001; Rosadio, *et al.*, 2012).

Un estudio en los departamentos de Puno y Junín, evidenciaron que las muertes se concentran en la etapa neonatal, siendo críticos los primeros 30 días de edad, afectando principalmente a las crías entre la segunda y tercera semana de edad, periodo crítico que debe ser protegido por los anticuerpos maternos de la madre vacunada antes del parto y aplicación de medidas preventivas de manejo (Ameghino *et al.*, 1991; Yaya y Rosario, 2005).

Existen vacunas sistémicas contra la enterotoxemia generada en anacultivos que confieren protección a base de inmunoglobulina G, pero esta sólo actúa cuando el microorganismo ha producido daño tisular y reacción inflamatoria. A diferencia, la IgA protege las superficies mucosas del tracto intestinal uniéndose a los potenciales antígenos impidiendo la adhesión a las superficies epiteliales y eliminando por exclusión inmune al patógeno, evitando de ese modo el daño generado por la bacteria. Es por ello que se conviene estimular este tipo de respuesta para lo cual la vacuna con antígeno inactivado debe aplicarse de manera local y en altas concentraciones (Tizard, 2013; Yaya y Rosario, 2005).

Es por ello que el presente estudio maneja la hipótesis que la vacuna con antígeno clostridial por vía oral en crías de alpacas promueve una mayor expresión de genes de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  en la mucosa intestinal, teniendo por objetivo determinar la cuantificación relativa de expresión de estos genes y diferencias entre los grupos experimentales; con la finalidad de buscar una vacuna oral que aplicados dentro de las primeras semanas de edad estimule al sistema inmune de mucosas con el fin de producir cantidades suficientes de IgA que permitan una protección de las crías contra la enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens* en las edades de mayor vulnerabilidad.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los camélidos se clasifican en el Orden *Artiodactyla*, Suborden *Tylopoda* y Familia *Camelidae*. Actualmente, la familia *Camelidae* está formada por dos tribus: *Camelini* y *Lamini*. La tribu *Camelini* habita en zonas desérticas de Asia y África, y se les conoce como Camélidos del Viejo Mundo. Por otro lado, la tribu *Lamini* habita en América del Sur a lo largo de la Cordillera de los Andes y se le conoce comúnmente como Camélidos Sudamericanos (CSA) o del Nuevo Mundo (Jiménez *et al.*, 2010).

Los CSA incluyen dos especies silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*); y dos especies domésticas: la llama (*Lama glama*) y la alpaca, cuyo nombre científico originalmente era *Lama pacos*. Al comparar la morfología de incisivos de restos arqueológicos de la puna peruana, así como características del pelaje y patrones de conducta, se detectó similitudes entre alpacas y vicuñas (Wheeler, 1995). Pero estudios hechos en el análisis de la secuencia parcial del gen citocromo b, utilizando la técnica de microsatélites, así como también en las bandas G de los cromosomas y genes mitocondriales, demostraron que la alpaca es la forma doméstica de la vicuña y la llama del guanaco dada la alta similitud genética, apoyando la proposición de cambio de nombre de la alpaca a *Vicugna pacos* (Kadwell *et al.*, 2001).

Desde hace 6 000 a 5 500 años se detectan las primeras llamas y alpacas. A partir de esa fecha, restos orgánicos de camélidos neonatos comienzan a aumentar sostenidamente, hasta llegar a constituir el 70% de todos los restos. Este aumento sugiere mortalidad debida a problemas epidemiológicos a causa de la domesticación (Wheeler, 1995).

## **2.2. LA ALPACA**

La alpaca es una especie nativa de la región andina, patrimonio de algunos países como Perú, Bolivia, y en menor cuantía de Chile y Argentina. (Ameghino y DeMartini, 1991). El Censo Nacional Agropecuario en el 2012, muestra un crecimiento del 50% en la población alpaquera desde el último censo. Un total de 3.7 millones de Alpacas viven en nuestro territorio representando el 83% de la población mundial, seguida de Bolivia con el 9.5% y otros países. En el Perú el 99% se encuentra en poder de pequeños criadores y el 1% restante en diversas formas organizativas. La población de alpacas se encuentra distribuida en 17 departamentos de la región sur y centro del país, siendo Puno, Cusco y Arequipa las regiones que concentran la mayor producción. Luego siguen Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, entre otras regiones (MINAGRI, 2015).

### **2.2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA**

La crianza de esta especie tiene una real importancia económica debido no sólo por la producción de fibra, sino también por su carne, valiosa fuente de proteínas al alcance de los campesinos; aparte de la producción de cueros y pieles de las que se derivan ciertas actividades artesanales, lo que significa fuente de trabajo y contribución notable a la economía de la zona. El sistema de crianza es exclusivamente del tipo extensivo y en zonas sobre los 4200 msnm., donde no es posible la agricultura ni la crianza rentable de otras especies de animales domésticos (Ameghino y DeMartini, 1991).

El 80-85% de la población de ganado alpacuno comprende un nivel tecnológico bajo y se encuentra en las comunidades y parcelas campesinas, mientras que la diferencia pertenece a empresas, todavía existentes, de tipo social, y cooperativas, pequeños y medianos criadores, así como empresas privadas. La crianza de alpacas por los productores comunales se caracteriza porque las condiciones de manejo, sanidad y nutricionales son muy precarias, y se dan severas condiciones de hacinamiento y subalimentación. Esto trae como resultado un alto índice de enfermedades infecciosas (enterotoxemia, colibacilosis, neumonías, necrobacilosis, entre otras) y parasitarias en sus animales, así como un rendimiento bajo de fibra y carne (Ameghino y DeMartini, 1991; Bustinza, 2001).

La mortalidad en crías de alpacas constituye una de las mayores causas de pérdidas económicas en la producción de esta especie y causa una seria limitación técnica y económica, tanto para los trabajos de selección, así como para los reemplazos trayendo un retraso en el crecimiento de la población alpaca. También significa pérdidas directas que inciden en la producción de fibra, carne y subproductos, así como también, pérdidas de divisas para el país por la fibra que se deja de producir. Es por eso que cada esfuerzo económico-práctico deberá ser dirigido para minimizar dichas pérdidas, y no cause una descapitalización y desaliento como para que la ganadería alpaca deje de ser una actividad rentable (Ameghino y DeMartini, 1991).

### **2.2.2. MORTALIDAD NEONATAL**

Las especies domésticas de CSA, alpacas y llamas, presentan las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en los primeros meses de vida al igual que otras especies domésticas en las condiciones de explotación del altiplano. Las pérdidas de crías de alpacas dentro de los primeros tres o cuatro meses de vida alcanzan cifras elevadas que en algunos casos pueden superar el 50% de los animales nacidos (Fernández-Baca, 2005). Según Bustinza (2001), la mortalidad puede alcanzar hasta el 80% de las crías de alpacas. La elevada mortalidad de las crías es uno de los principales factores que limitan su productividad en el altiplano andino. Las principales causas de mortalidad neonatal en estas especies son las enfermedades infecciosas y el manejo inadecuado (Ameghino y De Martini, 1991).

La enterotoxemia, la diarrea neonatal, los procesos respiratorios agudos y las septicemias son las enfermedades infecciosas más frecuentes que causan mayor mortalidad en las crías de CSA. La prevención y control de estas enfermedades es clave para la mejora de la producción y conservación de estos animales (Martín *et al.*, 2010).

### **2.3. ENTEROTOXEMIA**

La enterotoxemia es la principal causa de mortalidad neonatal en el sur del Perú, tanto a nivel de empresas ganaderas así como de comunidades (Ameghino y DeMartini, 1991; Ramírez, 1991). Causa una mortalidad que a veces llega al 80% y aún porcentajes mayores, sobre el total de crías nacidas. Esta es una enfermedad aguda que se ve en

crías principalmente durante los primeros 30 días de edad, pudiendo observarse a partir de los 2-3 días de nacidos y afectando principalmente a las crías entre los 15 y 21 días de edad (Ramírez *et al.*, 1998). Esto trae como consecuencia un desmejoramiento de las condiciones físicas de las crías afectadas. El término enterotoxemia es descriptivo para la intoxicación o envenenamiento que ocurre a partir de toxinas que son producidas en los intestinos por el microorganismo responsable (Ameghino y DeMartini, 1991).

La enterotoxemia de las crías de alpacas es una infección aguda ocasionada por la acción de las enterotoxinas del *Clostridium perfringens* tipos A y C. Investigaciones realizadas corroboran estas afirmaciones (Rosadio *et al.*, 2008; Pérez, 2010), donde se encontró que el 99.6% de casos fatales de la enfermedad correspondían a *C. perfringens* tipo A y el diferencial al tipo C. Estudios realizados sugieren que el complejo enterotoxémico no es producto de una infección única y, tal vez, sea consecuencia de interacciones patológicas de exotoxinas clostridiales con infecciones primarias de parásitos intracelulares como *Eimeria*, o virus enteropatógenicos como Coronavirus y Rotavirus (Rosadio *et al.*, 2012).

La presencia de *Eimeria macusaniensis* en animales muertos por enterotoxemia ha sido reportada (Rosadio y Ameghino, 1994; Palacios *et al.*, 2006), y demostrada en otros estudios, donde el 30.6% de animales con enterotoxemia, indicó la coexistencia de masiva de este parásito, sugiriendo que las infecciones coccidiales podrían ser un factor facilitador de la multiplicación clostridial o de la excesiva producción de toxinas necesarias para generar la enfermedad. Por otro lado, las severas lesiones necróticas de las mucosas intestinales fueron consideradas, inicialmente, como consecuencia de las toxinas  $\alpha$  y  $\beta_2$  del *C. perfringens*, tipo A (Pérez, 2006); sin embargo, la presencia de numerosas estructuras parasitarias correspondientes a *E. macusaniensis* fueron, también, interpretadas como potenciales patologías producto de la replicación de estadios inmaduros coccidiales (Rosadio *et al.*, 2010). Por lo tanto, la presencia de este parásito en animales muertos por enterotoxemia permite proponer a las infecciones por *Eimeria spp.* como uno de los posibles factores desencadenantes o predisponentes para el establecimiento de la enterotoxemia en la alpaca. Además se sospecha de cepas patógenas de *E. coli* que podría, al igual que *Eimeria*, generar un necrosis de células epiteliales, generando un ambiente apropiado para el crecimiento masivo del *Clostridium* con la consiguiente producción de sus toxinas (Luna, 2009)

En la práctica se ve que la enterotoxemia suele presentarse generalmente en crías en buen estado nutricional, cuando existe abundancia de pastos, y por lo tanto cuando las madres tienen abundante cantidad de leche. También se considera que está asociada a deficientes condiciones de higiene y manejo, cuando existe una sobrepoblación de animales, como ocurre en febrero y marzo, cuando hay una gran población de neonatos debido a la casi culminación de la campaña de parición. Esta época del año donde las temperaturas se elevan y hay mayor cantidad de lluvias, parece activar los esporos bacterianos encontrados en los pastos contaminados, recuperando el estado vegetativo y produciendo la enfermedad (Ameghino y DeMartini, 1991; Martin *et al.*, 2010).

### **2.3.1. ETIOLOGÍA: *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* es una bacteria ubicua que secreta numerosas enzimas y toxinas. Pertenece al phylum *Firmicutes*, Clase *Clostridia*, Orden *Clostridiales*, Familia *Clostridiaceae*, Genero *Clostridium*, Especie *C. perfringens* (Hurtado, 2011). Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y parecen tener dos hábitats principales; el suelo y el tracto intestinal donde forma parte de la flora microbiana normal de animales de sangre caliente (en especial el tipo A); mientras que otros (tipos B, C, D y E) son menos comunes en el tracto intestinal y pueden ser ocasionalmente encontrados en el ambiente (Vadillo *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2009).

Se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo rectangular con un tamaño de 0.6 a 2.4  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1.3 a 19  $\mu\text{m}$  de largo, que se puede encontrar aislado o en parejas, rara vez en cadena; pudiendo tener una forma cocoide o cúbica en cultivos jóvenes o elongados en cultivos viejos; es inmóvil y presenta una cápsula de péptidoglicano. Rara vez forma esporas, y es variable según la cepa; los esporos son de gran tamaño, ovoides, centrales o subterminales, deformando ligeramente la bacteria. Esta bacteria es anaerobia estricta relativamente aerotolerante, y se puede cultivar en presencia de un 5% de oxígeno. Crece entre 20 y 50°C, en un intervalo de pH de 5.5 a 8; la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 37 y 45°C. Este microorganismo crece rápidamente en los tejidos y en los cultivos. En medio líquido, el crecimiento se acompaña de una producción abundante de gas, estimulada por la presencia de azúcares fermentables. En medio sólido con sangre, las colonias son circulares, regulares, lisas, de color grisáceo y aparecen dos zonas de hemólisis (Vadillo *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2009).

Las características bioquímicas más importantes para su identificación son que producen proteasa, gelatinasa y fosfolipasa C; no producen lipasa; acidifica la glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa con producción de gas, y como productos terminales de la fermentación de la glucosa se obtienen ácido acético, butírico, láctico, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, lo que le confiere un ambiente anaeróbico de crecimiento (Vadillo *et al.*, 2002; Hurtado, 2011).

La virulencia de esta especie está dada por su gran número y diversidad de exotoxinas y enzimas sintetizadas relacionadas con su potencial patógeno, las cuales son la base de su clasificación. Así, el tipo A posee sólo la toxina  $\alpha$ ; el tipo B las toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ; el tipo C las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ ; el tipo D las toxinas  $\alpha$  y  $\epsilon$ ; y el tipo E las toxinas  $\alpha$  y  $\iota$  (Petit *et al.*, 1999; Vadillo *et al.*, 2002). La toxina  $\alpha$ , la toxina más importante y la que producen los cinco tipos, es una lecitinasa (fosfolipasa) capaz de lisar eritrocitos, plaquetas, leucocitos y células endoteliales. Esta toxina provoca una hemólisis masiva junto a un incremento de la permeabilidad vascular y de la hemorragia (la cual se ve potenciada por la destrucción de las plaquetas), destrucción tisular, toxicidad hepática y disfunción miocárdica (bradicardia, hipotensión). Las mayores cantidades de toxina  $\alpha$  se producen por el tipo A. La toxina  $\beta$  es la responsable de la estasia intestinal, destrucción de la mucosa con formación de lesiones necróticas y evolución a una enteritis necrosante. La toxina  $\epsilon$ , una protoxina, se activa por la tripsina y aumenta la permeabilidad vascular de la pared del tubo digestivo. La toxina  $\iota$ , la cuarta toxina letal que produce el tipo E, tiene una actividad necrosante y aumenta la permeabilidad vascular (Murray *et al.*, 2009).

Además de las exotoxinas existen otros factores de virulencia presentes, los cuales se han asociado a problemas entéricos. Uno de ellos es la enterotoxina (CPE) que es sintetizada principalmente por el tipo A. La toxina es termolábil y sensible a la pronasa. La exposición a la tripsina triplica la actividad tóxica. La enterotoxina se produce durante la fase de transición desde las células vegetativas hasta las esporas, y se libera junto a las nuevas esporas cuando las células están sometidas a las fases finales de la formación de estas (esporulación). Las condiciones alcalinas del intestino delgado estimulan la esporulación. La enterotoxina liberada se une a los receptores de la membrana con borde en cepillo del epitelio del intestino delgado en el íleon (fundamentalmente) y en el yeyuno, pero no en el duodeno. La inserción de la toxina en la membrana celular modifica su estructura y conlleva una alteración de la permeabilidad de membrana la cual provoca pérdida de fluidos y electrolitos en la

mucosa intestinal. Por otra parte, la enterotoxina actúa como un superantígeno que estimula la actividad de los linfocitos T (Murray *et al.*, 2009). Otro factor de virulencia es la toxina  $\beta_2$ , la cual posee una actividad biológica similar a la toxina  $\beta$ , pero no presenta homología en la secuencia de aminoácidos de la toxinas (Smedley *et al.*, 2004).

### **2.3.2. PATOGENIA**

La principal vía de ingreso de *C. perfringens* es la oral, principalmente por el contacto de las crías con el pasto y ubres cubiertas de lodo. Es probable que las crías ingieran una masiva cantidad de esporas y/o células vegetativas de *C. perfringens* (Ramírez *et al.*, 1998). Posteriormente, en el lumen intestinal un ligero pH alcalino y el incremento de carbohidratos en la dieta (cambio de dieta, inicio de consumo de forraje) o una excesiva ingestión de leche que ocasione indigestión, lo que de alguna manera produciría una estasis del contenido lácteo con alteración de los movimientos peristálticos, favorecerían el desarrollo de un ambiente óptimo para la multiplicación de *C. perfringens* tipo A, sintetizándose la toxina alfa. Aunque también se sospecha que este mecanismo también favorece la excreción de otras toxinas posiblemente la CPE, durante la esporulación de la bacteria en el lumen (Ameghino y De Martini, 1991). Una vez sintetizadas las toxinas en el lumen intestinal, estas provocan alteración en la permeabilidad de las células epiteliales de la mucosa intestinal (yeyuno e íleon), resultando en acumulación de fluidos y electrolitos dentro del lumen (deshidratación intraluminal), así como la absorción de toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez *et al.*, 1998). El animal, probablemente, muera por acidosis metabólica de carácter fatal por pérdida de la reserva alcalina de la sangre y tejidos hacia el lumen intestinal o por shock debido a que las toxinas ocasionan daños irreversibles en el endotelio vascular y afectan los principales órganos vitales, como el tejido nervioso. Generalmente, estas manifestaciones clínicas transcurren rápidamente y finalizan con la muerte súbita del animal (Ameghino y De Martini, 1991; Novoa y Flores, 1991).

### **2.3.3. SIGNOS CLÍNICOS**

Muchas veces lo único que se puede observar es la muerte súbita sin diarreas, las crías afectadas degeneran rápidamente en ese estado, pudiendo mostrar antes depresión y anorexia (dejan de mamar y/o comer), postración, abdomen abultado con notable

presencia de gases en el intestino y dolor (observable por los ojos cerrados y los miembros anteriores estirados), cabeza apoyada en el suelo, a veces se observa polidipsia, y en otras apetito depravado (ingestión de tierra o piedrecillas), la temperatura es variable, pudiendo ser normal o llegar a 40°C, disminuyendo cuando el animal agoniza. En su etapa final, se observan alteraciones nerviosas manifestadas por convulsiones y opistótono. Es probable que las crías infectadas con cantidades subletales de bacterias y toxinas, presenten signos muy leves e inadvertidos; se recuperan, y forman anticuerpos específicos (Fowler, 1998; Hurtado, 2011).

#### **2.3.4. LESIONES ANATOMOPATOLÓGICOS**

En las crías con enterotoxemia se observa externamente el abdomen distendido por la presencia de gas en el intestino. A la apertura de la cavidad abdominal es perceptible un olor característico a la enfermedad y puede observarse acumulación de fluido. Los intestinos están distendidos con fluido acuoso rico en electrolitos, cuyo color varía de acuerdo al tipo de ingesta, pudiendo ser blanquecino, amarillento, verdoso y plomizo. El intestino delgado, particularmente yeyuno e íleon, se encuentran congestionados y hemorrágicos. En intestino grueso se presentan hemorragias focales, conteniendo heces duras. Las placas de Peyer se encuentran inflamadas, siendo más notorios en el intestino grueso. Los ganglios linfáticos mesentéricos, aparecen incrementados de tamaño, congestionados y hemorrágicos. En el estómago glandular, la mucosa puede estar congestionada o hemorrágica. En la cavidad torácica, es posible observar acumulación de fluidos y a veces pulmones congestionados y edematosos. Los nódulos linfáticos torácicos incrementados de tamaño y hemorrágicos. El timo se presenta congestionado y con hemorragias petequiales en su superficie. En el saco pericárdico es posible observar una gran cantidad de exudado seroso y ligeramente viscoso (Oha, 1994; Fowler, 1998). El bazo se puede encontrar aumentado de tamaño. El hígado puede estar aparentemente normal, pero algunas veces se encuentra congestionado. En los riñones es posible observar congestión en la corteza renal y a veces, hemorragias petequiales en su superficie. La vejiga generalmente se encuentra distendida debido a la acumulación de orina como consecuencia de parálisis por daño nervioso o por los fuertes cólicos abdominales. El encéfalo se presenta severamente congestionado observándose el acumulo de líquido cefalorraquídeo entre las meninges (Oha, 1994; Hurtado, 2011).

### **2.3.5. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico se realiza principalmente de forma clínica y pocas veces se usan pruebas auxiliares para confirmar el diagnóstico de campo. Sin embargo, se ha reconocido que el diagnóstico de la enfermedad se debe realizar en base a las lesiones anatomopatológicas e histológicas (Pérez, 2006). La detección al microscopio de bacilos grampositivos en las muestras clínicas, generalmente en ausencia de leucocitos, puede ser un hallazgo muy útil como consecuencia de la característica morfología de estos microorganismos. Este microorganismo crece rápidamente en los tejidos y en los cultivos, es hemolítico y activo desde el punto de vista metabólico. Se puede detectar en los medios de cultivo sencillos tras un periodo de incubación de 1 día o menos. En condiciones adecuadas, *C. perfringens* se puede dividir cada 8 o 10 minutos, por lo que su crecimiento en los medios de agar y en los caldos de hemocultivo se puede detectar después de una incubación de sólo unas horas (Murray *et al.*, 2009). Otras pruebas como frotices directos de contenido intestinal o detección de anticuerpos antitoxina alfa no son definitivas, sugiriéndose la detección de toxinas en fluidos corporales (Hurtado, 2011). Existen además pruebas serológicas como ELISA para la detección de anticuerpos contra *C. perfringens*. La detección de las toxinas en individuos afectados es una herramienta que puede ser utilizada (Pérez, 2006; More, 2013).

Actualmente, técnicas moleculares como la PCR han demostrado ser herramientas confiables para el diagnóstico y la determinación de los principales factores de virulencia de *C. perfringens* (Hurtado, 2011).

### **2.3.6. CONTROL Y PREVENCIÓN**

Establecida la enfermedad en el rebaño es necesaria la rotación de los dormideros, y si es posible, cambiar también de las canchas o parideros a lugares más alejados. Aunque, todos estos procedimientos han mostrado no traer significativa reducción de la mortalidad una vez establecida la epizootia (Melo, 1997). La administración de antibióticos de uso oral a todas las crías del rebaño afectado durante tres días consecutivos permitirá reducir la carga bacteriana y evitar infecciones concurrentes disminuyendo así la mortalidad y evitando la diseminación del agente en los campos (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

El uso de vacunas a partir de cepas aisladas de campo asociado a medidas de higiene adecuadas, como la rotación continua de canchas, es la medida de prevención más adecuada (Moro, 1987). Un estudio realizado emplearon vacunas vía sistémica usando un anacultivo en base a cepas de *C. perfringens* aisladas de casos clínicos, aplicando tanto a madres como a crías, lograron una disminución significativa de la mortalidad por enterotoxemia (Yaya y Rosadio, 2005). También existe un toxoide elaborado a base de la CPE, que produce anticuerpos anti-CPE, sin embargo, aún no se ha podido determinar su efectividad en campo (Ellis, 2006). Además, el uso de antiparasitarios para el control de la eimeriosis, podría ser una buena medida de prevención, debido a que se sugiere la infección mixta de *C. perfringens* con *Eimeria spp*, para la producción de enterotoxemia (Rosadio *et al.*, 2010).

#### **2.4.SISTEMA INMUNE**

Los camélidos nacen con un sistema inmune bastante inmaduro por lo que se encuentran incapacitados para responder adecuadamente a agentes patógenos. Las crías de alpacas nacen agamaglobulinémicas, es decir sin defensas inmunológicas, esto es consecuencia de la estructura física de la placenta, de tipo microcotiledonaria y epiteliocorial, que impide la transferencia de inmunoglobulinas (Igs) de la madre al feto, pero después de la ingesta de calostro se observan aumentos lineales de concentración de IgG de manera similar a lo que ocurre en otras especies domésticas. (Ameghino y DeMartini, 1991; Flodr *et al.*, 2012).

La IgG, componente del 85% de las proteínas del suero transferidas pasivamente a las crías, es la principal inmunoglobulina absorbida por el neonato. También se transfiere, aunque en menores cantidades, la IgM. Se desconoce, sin embargo, los isotipos de IgG preferentemente absorbidos, ya que las inmunoglobulinas de los camélidos son únicas y difieren dramáticamente en relación a otras especies de animales. En los camélidos, se conoce que más del 75% de las proteínas séricas son moléculas de IgG carentes de cadena ligera y referidas como IgG2 e IgG3, y característicamente mucho más pequeñas (90 kDa) que los anticuerpos convencionales (150 kDa), con capacidades de mejor penetración tisular y una mejor biodistribución. Estos anticuerpos, denominados microglobulinas, serían mucho más eficientes, por ejemplo, para neutralizar enzimas, que los anticuerpos convencionales (Flodr *et al.*, 2012; Wernery, 2001).

#### **2.4.1. INMUNIDAD PASIVA**

La protección inmunológica del neonato, durante las primeras semanas de vida, depende de la ingestión de calostro de buena calidad, así como de la eficiente permeabilidad intestinal durante las primeras horas de vida. El factor determinante para alcanzar niveles protectivos de IgG séricas en las crías es la concentración de IgG presente en el calostro. La producción de calostro con altos niveles de anticuerpos, así como la adecuada ingestión por parte de la cría no siempre son las esperadas, desencadenándose la denominada falla de transferencia pasiva (FTP) de inmunoglobulinas que puede ser completa o parcial, con niveles de anticuerpos séricos menores a 1000 mg/dl a las 48 horas del nacimiento. La ocurrencia de FTP en alpacas neonatas ha sido detectada con prevalencias de 9.0 a 20.5%, muchas veces asociada a una alta incidencia de enfermedades infecciosas (Weaver *et al.*, 2000; Flodr *et al.*, 2012).

Investigaciones realizadas han demostrado que los anticuerpos calostrales se absorben activamente utilizando receptores Fc especializados presentes en las células epiteliales del intestino e ingresan al sistema circulatorio a través de los vasos quilíferos. Estas células, al ser remplazadas por células epiteliales maduras, 18 a 24 horas después del nacimiento, incapacitan la absorción intestinal de Igs. Se desconoce el momento de cierre del intestino, pero el aumento lineal de la concentración de IgG séricas durante las primeras 24 horas seguidas de un descenso a las 48 horas, evidencia la existencia de un patrón similar al de terneros con un tiempo de absorción óptimo entre las 0 y 12 horas de edad. Tiempo después, la pared intestinal se encuentra incapacitada para absorber los anticuerpos calostrales (Flodr *et al.*, 2012; Garmendia *et al.*, 1987).

#### **2.4.2. INMUNIDAD INNATA**

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa que tienen que atravesar los patógenos cuando ingresan al organismo, generando una respuesta rápida sin necesidad de inducción o maduración de linfocitos. La respuesta inmune innata no es específica del patógeno que invade y no genera memoria inmunológica (Janeway y Medzhitov, 2002; Dionisio, 2012). El intestino posee armas fisicoquímicas, de protección innata para la invasión microbiana, que incluyen los movimientos peristálticos, secreción de mucus, sales biliares, enzimas digestivas, péptidos antimicrobianos y proteínas

secretadas, de esta forma, gran cantidad de patógenos son neutralizados y eliminados a través de las heces. Se ha determinado en alpacas la expresión de péptidos antimicrobianos producidos por células y almacenados en gránulos secretorio, siendo algunos producidos por estímulos pro-inflamatorios (More, 2010; Herrera 2012).

Las células que forman el sistema inmune innato son los macrófagos, las células dendríticas y las células asesinas naturales (NK). En el macrófago, célula presentadora de antígeno, el microorganismo es degradado y los fragmentos que resultan se presentan al linfocito T para iniciar la activación de la respuesta inmune adaptativa y el establecimiento de una inmunidad protectora a largo plazo creando una intersección entre los dos tipos de inmunidad. Las células dendríticas son más eficientes como células presentadoras de antígeno que los macrófagos, pues sus lisosomas degradan en menor grado a los antígenos (Janeway, 2002; Dionisio, 2012). Las células NK actúan destruyendo células infectadas y células que no expresan moléculas CMH de clase I, así como activando a los macrófagos mediante la secreción de IFN- $\gamma$  para conseguir la eliminación de los microorganismos fagocitados (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

La respuesta inmune innata se estimula al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), utilizando receptores especiales. Un tipo de estos receptores son los llamados receptores tipo peaje (TLR) que reconocen PAMP (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Dionisio, 2012). De esta manera, cuando un TLR reconoce a su PAMP específico se produce una rápida activación que conlleva cambios a nivel intracelular que establecerá la activación de la respuesta inflamatoria. Los TLR se encuentran en macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Cummings, 2004; Nathanson *et al.*, 2007).

### **2.4.3. INMUNIDAD DE LAS MUCOSAS**

El sistema inmunitario de las mucosas se encuentra en constante desarrollo desde el nacimiento, y por su extensión y localización está expuesto a una gran variedad y cantidad de antígenos, desarrollando una actividad inmunológica permanente y manteniendo un microambiente fisiológicamente desviado hacia respuestas antiinflamatorias, impidiendo o regulando la colonización en el intestino de los microorganismos (Zaldívar, 2002; Porporatto *et al.*, 2007). El intestino es considerado como el órgano linfoide más grande del cuerpo por el número de linfocitos y la cantidad

de inmunoglobulinas que produce. La línea de defensa en las mucosas incluyen factores químicos (tales como la lisozima y otras muchas enzimas), físicos (como la descamación o el peristaltismo intestinal), y biológicos (fundamentalmente la microbiota competidora) (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Dionisio, 2012; Herrera, 2012).

El mucus en la superficie apical compuesta de productos secretados por el epitelio, y unidas a las secreciones biliares y pancreáticas son parte del complejo fisicoquímico de defensa intestinal que juega un rol esencial en la protección de la mucosa intestinal, atrapando los potenciales patógenos y eliminándolos por movimientos peristálticos. Así mismo las uniones estrechas de la capa epitelial intestinal previenen el pasaje de antígenos a la capa subyacente (Mayer, 2003; More, 2013).

Es necesario que la respuesta inmune de mucosas no sea exagerada, estableciendo un grado de tolerancia inmunológica importante hacia microorganismos de la flora normal intestinal. La respuesta inmune innata es la primera barrera que se establece mientras se crea la respuesta inmune adaptativa, donde los linfocitos T y B lucharán específicamente contra el agente agresor (Pabst *et al.*, 2007).

#### **2.4.3.1. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO AL INTESTINO (GALT)**

La mucosa intestinal contiene una gran cantidad de tejidos linfoides, que se dividen en, sitios inductores: las placas de Peyer (PP), nódulos linfoides mesentéricos (NLM) y folículos linfoides aislados; donde el antígeno es localizado, endocitado, procesado y presentado a los linfocitos T y B iniciando las inmuno-reacciones; mientras que en los sitios efectores: lámina propia (LP) y epitelio intestinal, ocurre la secreción de anticuerpos y se montan respuestas mediadas por células (linfocitos de la lámina propia y linfocitos intraepiteliales). La actividad conjunta de los sitios inductores y efectores genera a nivel de mucosa y suero una respuesta rica en IgA y una inmunidad celular con funciones citotóxicas, regulatorias y de memoria. Luego del contacto inicial del antígeno en los sitios inductores, los linfocitos T y B se activan, proliferan y diferencian para migrar a distintos sitios efectores (LP y epitelio intestinal), en el que se sitúa una población única de linfocitos intraepiteliales. En estos sitios del GALT se localiza el 80% de las células B activadas del organismo, y un 80 a 90% de éstas se diferencia a células plasmáticas productoras de IgA (Yuan y Walker, 2004; Porporatto *et al.*, 2007).

El GALT de los rumiantes se encuentra organizado en PP y en menor proporción como células intraepiteliales en toda la lámina interna. Los rumiantes poseen las PP del íleon (PPI) y las PP yeyunales (PPY), las cuales difieren en su desarrollo, composición celular y función. Estas PP consisten en masas compactas de linfocitos dispuestos en folículos y recubiertos por un epitelio de células M, que constituye la puerta de entrada de patógenos. Estas son células epiteliales no secretoras carentes de glucocálix, que les permite captar antígenos directamente del lumen. Su función principal es la absorción de partículas y moléculas desde la luz intestinal mediante endocitosis o fagocitosis, transportándola en vesículas hasta la membrana basal, región basolateral rica en linfocitos, siendo liberada al espacio extracelular y captado por las células dendríticas; además, debido a su bajo contenido en lisozima, pueden transportar antígenos con nula degradación enzimática. Su superficie contiene receptores específicos para la región Fc de la IgA, por lo que puede fijar y transportar complejos antígenos-anticuerpos, así como bacterias, virus y parásitos (Zaldivar, 2002; Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

Los NLM son los mayores del organismo y los primeros en desarrollarse embriológicamente. Drenan a través de los capilares linfáticos de las PP y las acumulaciones linfoides del GALT. En los NLM, además de ocurrir la respuesta inmune específica, las células B activadas en las PP terminan de diferenciarse a plasmocitos (Porporatto *et al.*, 2007).

Distintas células leucocitarias se encuentran distribuidas a lo largo de la lámina propia, incluyendo células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y T, encontrándose también células plasmáticas productoras de IgA, y a su vez de IgG e IgM. Estos macrófagos y células dendríticas estarían involucrados en la presentación de antígeno *in situ*. Los Linfocitos Intraepiteliales son una población de células T que se encuentran adheridas a la superficie basolateral de los enterocitos, y actúan como células de memoria, que llegan al epitelio tras estimulaciones con antígenos provenientes de la dieta o sangre, siendo la mayoría linfocitos T (Ebert, 1990; Lefrancois *et al.*, 2002; Dionisio, 2012).

En las crías de rumiantes jóvenes, las PP se encuentran de manera predominante (80 a 90%) en el íleon y forman un solo agregado continuo de folículos linfoides que se extienden desde la unión ileocecal y pueden medir hasta 2 metros. El desarrollo de las PPI ocurre mucho antes del nacimiento alcanzando su tamaño máximo en una fase

temprana de la vida y después involucionan; en contraste, las PPY persisten durante toda la vida del animal (Parson *et al.*, 1989; Sanz, 2001; Tizard, 2013).

Un estudio en alpacas, encontró que las PPI en recién nacidos están en mayor número y más desarrolladas que las PPY, lo que sugiere un desarrollo de las PP en la etapa fetal y que estas van decreciendo con el tiempo en la etapa postnatal, mientras que las PPY se desarrollan y son más activas post nacimiento. En crías mayores de 14 días se observó un mayor crecimiento de las PPY, que presentan una región de linfocitos activos y otra de células no diferenciadas. Con la edad de las crías de alpacas se presenta un incremento de linfocitos intraepiteliales y del área linfoide en las PPY (Roca, 2011).

#### **2.4.4. INMUNIDAD ADAPTATIVA**

La inmunidad adaptativa es un mecanismo de defensa que protege las superficies mucosas con capacidad de reconocer y reaccionar específicamente frente a un gran número de antígenos generando células de memoria inmunológica, responsables de la respuesta secundaria tras un segundo o posterior contacto con el mismo antígeno, aumentando su intensidad e induciendo una defensa rápida y duradera (Janeway, 2002; Strieter *et al.*, 2002; Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

Cuando los péptidos antigénicos son presentados en las moléculas CMH II por una CPA, se activa la subpoblación de linfocitos Th. Dependiendo de la citoquinas que produzcan las CPA durante la presentación del antígeno al Th, éste se diferencia a células efectoras diferentes, los Th1 y los Th2, que colaboran en la inmunidad celular (a cargo de los linfocitos T) y en la inmunidad humoral (a cargo de los linfocitos B), respectivamente (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2015).

Las células efectoras B son las células plasmáticas productoras de inmunoglobulina y realiza su acción mediante la inmunoexclusión e inmunoeliminación de los antígenos por los anticuerpos, IgG e IgM a nivel sistémico y del tipo IgA secretora producida localmente a nivel intestinal. Las células plasmáticas intestinales productoras de IgA derivan de las células B localizadas en las placas de Peyer o en los folículos solitarios. El proceso se inicia mediante el contacto del antígeno con las CPA que lo procesan y presentan a los linfocitos de las PP y de los folículos, generando la proliferación de un

clon antígeno-específico que pasa a sangre, se distribuye como células de memoria sistémicamente y vuelve a la lámina propia donde se aloja de forma definitiva. Ante un nuevo contacto con el antígeno, los linfocitos T proliferan, se desencadena por un lado una respuesta inmune celular y por otro, un estímulo para que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas productoras de IgA secretora antígeno-específica (Fagarasan y Honjo, 2003; Dionisio, 2012). Algunos pocos estudios sugieren la existencia de dos distintos linajes de linfocitos B en camélidos, un linaje se encargaría de secretar los clásicos anticuerpos de cuatro cadenas y el otro linaje expresaría los anticuerpos carentes de las cadenas livianas (De Genst *et al.*, 2006; Herrera, 2012).

El hecho de que la estimulación de linfocitos antígeno-específicos que se produce localmente en el intestino se haga efectiva también a nivel sistémico, ha dado lugar a un campo muy relevante de investigación como es el de las vacunas administradas oralmente. El proceso de inmunoexclusión de antígenos mediante anticuerpos sucede no sólo en condiciones patológicas sino en condiciones fisiológicas. Las células dendríticas retienen bacterias comensales de manera que se induce la producción de IgA específica para eliminar las bacterias evitando su penetración en la mucosa y sin producir una respuesta a nivel sistémico (Macpherson y Uhr, 2004; Dionisio, 2012).

#### **2.4.4.1. INMUNOGLOBULINAS**

Las inmunoglobulinas o anticuerpos, son una familia de glucoproteínas con una estructura relacionada producidas por los linfocitos B en forma membranaria o secretados solubles, característicos de la respuesta inmune adquirida de base humoral. Los anticuerpos unidos a la membrana sirven de receptores que median la activación inducida por el antígeno de los linfocitos B, mientras que los secretados funcionan como mediadores de la inmunidad humoral específica, al activar varios mecanismos efectores que sirven para eliminar los antígenos unidos a ellos (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2015).

Las inmunoglobulinas juegan un rol central en el sistema inmune adaptativo mediante el reconocimiento de los patrones moleculares específicos de antígenos externos. Posterior a la estimulación y diferenciación de los linfocitos B a plasmocitos, se sintetizan las inmunoglobulinas, y estas circulan por la sangre y por la linfa donde se unen a los

antígenos extraños de manera específica, y mediante estas interacciones neutralizan la invasión y proliferación eliminando a los agentes patógenos específicos del hospedero (Su *et al.*, 2002; Pastoret *et al.*, 1998; Herrera; 2012).

#### **2.4.4.2. INMUNOGLOBULINA A**

La IgA es el isotipo de inmunoglobulina predominante en secreciones respiratorias e intestinales. Su producción local constituye entre 70-90% de todas las inmunoglobulinas presentes en las secreciones intestinales. En el suero existe en forma de un monómero (IgA sérica) mientras que en las secreciones intestinales se presenta casi exclusivamente en forma de dímeros de dos unidades monoméricas (Dionisio, 2012).

Las células plasmáticas de la lámina propia de la submucosa intestinal sintetizan y secretan IgA como dímeros unidos entre sí por la cadena J, y se transporta a la superficie mucosa por células epiteliales inmaduras, que están situadas en la base de las criptas. Estas células expresan el denominado “receptor de inmunoglobulina polimérico” (pIgR) en sus membranas basolaterales, al cual se une el dímero de IgA y la transporta por transcitosis hasta la luz intestinal mediante la fusión de la vesícula con la membrana. En el proceso de liberación, una parte del pIgR es hidrolizado por enzimas y el resto permanece formando una cadena adicional glicopolipeptídica llamada componente secretor (CS). Los N-glicanos del CS proveen a la IgA sitios de unión a las bacterias, además de que asegura la localización *in vivo* de la IgA secretora mediante su anclaje a las células epiteliales de las superficies mucosales que cubre el epitelio intestinal ejerciendo su capacidad aglutinante o neutralizante de los patógenos intestinales o sus toxinas (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

Los linfocitos Th2 son las células colaboradoras predominantes en los tejidos superficiales. Al ser estimulados, estos linfocitos secretan citoquinas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que induce el cambio preferente del isotipo IgA durante el desarrollo y la activación de los linfocitos B, mientras que la IL-6 es esencial para la diferenciación terminal de las células plasmáticas productoras de IgA. Otras citoquinas Th2, tales como IL-5 también promueve este proceso (Tizard, 2013; Dionisio, 2012).

La función más importante de la IgA, y en la que basa su actuación en la exclusión inmune, consiste en bloquear las adhesinas bacterianas o víricas a las células epiteliales, previniendo la colonización. La IgA no es bactericida pero puede activar el complemento, aunque sólo por la vía alternativa y la de las lectinas. En cualquier caso, no induce inflamación. Puede neutralizar virus y enzimas, tanto de origen vírico como bacteriano, pudiendo comportarse como opsonina y actuar en algunos sistemas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La IgA es la única inmunoglobulina que puede actuar a nivel intracelular, en el interior de las células epiteliales que la transportan hacia la superficie mucosa, en la cual se puede unir a las proteínas víricas, impidiendo la replicación. De igual modo, la IgA puede unirse a los antígenos que han penetrado en la submucosa formando con ellos complejos que se unen al pIgR, transportándose de forma activa en dirección a la luz intestinal (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

Monocitos, macrófagos, neutrófilos, y eosinófilos presentan CD89 (Fc $\alpha$ R) que, al igual que pIgR, permite la unión de la IgA. En este caso, partes de IgA que actúan como opsoninas, unidas a este receptor, pueden iniciar la producción de radicales superóxido e inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios. En algunas especies como aves y conejos, una parte de IgA puede llegar al hígado, vía porta, con la particularidad de que en el hígado los hepatocitos sintetizan pIgR, que se dispone en la membrana, facilitando la unión de la inmunoglobulina que después penetra en el citoplasma y es liberada en los conductos biliares. Esta razón justifica la riqueza de la bilis en IgA, constituyéndose en la vía principal por la que esta inmunoglobulina alcanza el intestino, y por la que los antígenos unidos a ella son eliminados (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

#### **2.4.4.3.CITOQUINAS**

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, menor de 30KDa, secretadas por ciertas poblaciones celulares que ejercen su efecto sobre otros blancos celulares, implicando una interacción compleja entre las células linfoides, células inflamatorias y hematopoyéticas efectuando una comunicación célula-célula, importante en el mantenimiento del balance fisiológico e inmunomodulación. Para su acción se unen a receptores celulares específicos presentes en la superficie de las células a activar o

estimular. Esta unión permite el desencadenamiento de traducción de señales intracelulares que llega hasta el núcleo, con la consiguiente activación de factores transcripcionales donde se sintetiza el ARNm, que permitirá la expresión de proteínas codificadas en el genoma celular (Janeway *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2002; More, 2013).

El principal rol de las citoquinas expresadas en el tracto intestinal para el montaje de respuesta de células Th, es la expresión y secreción de sIgA; es por eso que muchos protocolos de vacunaciones orales promueven la expresión de citoquinas de mucosas tipo Th1 y Th2 (Bokaya *et al.*, 1999) En los mecanismos de respuesta intestinal se ha determinado que el perfil de citoquinas, sea Th1 o Th2, dependerá de la naturaleza del antígeno, de su procesamiento y presentación. Es importante mencionar que el balance entre las citoquinas proinflamatorias e inflamatorias es crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Luego de la presentación antigénica, las células Th nativas son diferenciadas hacia los dos tipos de células T colaboradoras, las Th1 eminentemente para la activación de macrófagos; y las Th2 para la respuesta humoral mediada por anticuerpos (Perdue, 1999; Weigmann y Neurath, 2002; More, 2013).

#### **2.4.4.4.INTERLEUCINA 5**

La IL-5 es un activador de los eosinófilos y sirve de nexo principal entre la activación del linfocito T y la inflamación eosinófila. Es un homodímero de un polipéptido que contiene un dominio de cuatro hélices  $\alpha$  y es un miembro de la familia de citocinas del tipo I. La producen los linfocitos Th2, células T CD4, los mastocitos activados y eosinófilos. El receptor para la IL-5 es un heterodímero compuesto de una cadena  $\alpha$  única y de una cadena  $\beta$  común. La principal vía de transmisión de señales inducida por la IL-5 afecta a la cinasa Jano 2 (JAK2) y a transductores de la señal y activadores de la transcripción 3 (STAT3) (Abbas *et al.*, 2015; Lorentz *et al.*, 1999).

Las principales acciones de la IL-5 son activar a los eosinófilos maduros y controlar la producción de eosinófilos, estimulando el crecimiento y diferenciación de sus precursores en la médula ósea. Los eosinófilos activados tienen la capacidad de matar a los helmintos (Abbas *et al.*, 2015; Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Lorentz *et al.*, 1999).

La IL-5 ha sido identificada como factor importante en la producción de IgA producida por las células B, ayudando en la diferenciación de estas para plasmocitos. Estudios *in vitro* han demostrado que IL-5 actúa sinérgicamente con IL-2 e IL-4 para promover la secreción de IgA. La IL-5 es distribuida en la lámina propia del intestino estableciendo una distribución de IgA secretoria. Estudios *in vivo* mostraron que ratones deficientes en IL-5 tienen una pequeña pero significativa reducción en la concentración de IgA intestinal, en comparación con ratones que si producen IL-5 y son capaces de mantener una respuesta normal de IgA (Fontenele *et al.*, 2006; Husband, 2002).

#### **2.4.4.5.INTERLEUCINA 6**

Esta citoquina fue identificada inicialmente en el sobrenadante de cultivos de células mononucleares, las cuales habían sido estimuladas con mitógenos o antígenos, encontrando como su primera función que inducía la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B transformados. Se trata de una citoquina que participa en múltiples procesos, por lo que se dice que es pleiotrópica (Hinojosa, 2012; Santiago, 1995).

La IL-6 es una glicoproteína de 22 a 28 kDa producida por los macrófagos activados, fibroblastos, células endoteliales vasculares, células T y B, mastocitos, queratinocitos, células mesangiales, y otras células en respuesta a los PAMP (patrón molecular asociado a patógenos) y en respuesta a la IL-1 y el TNF. También es sintetizada por las células musculares durante el ejercicio. La IL-6 es un homodímero de la familia de citocinas polipeptídicas del tipo I. Su receptor consta de una cadena polipeptídica ligadora de citocinas y una subunidad transductora de señales (IL-6R y gp130), que también es el componente transmisor de señales de otras citocinas. El receptor para la IL-6 se conecta con una vía de transmisión de señales que activa al factor de transcripción STAT3, y se encuentran en las células T, neutrófilos, macrófagos, hepatocitos y neuronas (Abbas *et al.*, 2015; Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Tizard, 2013).

Su producción está estimulada por las endotoxinas bacterianas, IL-1 y el TNF $\alpha$ . Su principal misión es aumentar la respuesta de células del sistema inmune a otras citoquinas. La IL-6 es una citocina importante de las respuestas inflamatorias agudas que tiene efectos locales y sistémicos, y también afecta a la inmunidad adaptativa. Actúa sobre linfocitos T y B, células de la médula ósea y hepatocitos; e induce la

síntesis hepática de otros mediadores inflamatorios en el hígado, estimula la producción de neutrófilos en la médula ósea y promueve la diferenciación de linfocitos T cooperadores productores de IL-17. Es un importante mediador de la resistencia antibacteriana y regula la transición del proceso primario de la inflamación llevado a cabo por los neutrófilos a un proceso posterior dominado por macrófagos. La IL-6 estimula la diferenciación de linfocitos T, y es necesaria para las etapas finales de la transformación de linfocitos B en células plasmáticas. Además actúa como cofactor de la IL-5 en la síntesis de IgA y, de forma sinérgica con la IL-4, estimula la diferenciación de los linfocitos Th2 (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Tizard, 2013; Abbas *et al.*, 2015;).

#### **2.4.4.6.FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE $\beta$**

El TGF- $\beta$  es una citoquina regulatoria con funciones pleiotrópicas en el desarrollo de las células T, homeostasis y tolerancia. Es producido por múltiples linajes de leucocitos y células del estroma (Huber *et al.*, 2011; Herrera, 2012). Es una familia de moléculas muy relacionadas codificadas por genes diferentes, que está formado por cinco glucoproteínas (TGF- $\beta$ 1, 2, 3,4 y 5). Se secretan en forma de molécula inactiva o latente, para activarse posteriormente en la superficie celular por proteasas después de la unión a integrinas. Las células del sistema inmunitario sintetizan sobre todo TGF- $\beta$ 1. Son producidos por macrófagos activados, linfocitos T (T CD4<sup>+</sup> reguladores), linfocitos B, neutrófilos y plaquetas, y actúan sobre la mayoría de los tipos celulares, tales como macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, células dendríticas y fibroblastos (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Tizard, 2013; Abbas *et al.*, 2015).

Se sintetiza en forma de un precursor inactivo que se escinde mediante proteólisis en el complejo de Golgi y forma un homodímero. El TGF- $\beta$ 1 maduro se secreta de forma latente asociado a otros polipéptidos, que deben eliminarse fuera de la célula mediante digestión enzimática antes de que la citocina pueda unirse a sus receptores y ejercer sus efectos biológicos. El receptor para el TGF- $\beta$ 1 consiste de dos proteínas diferentes, el TGF- $\beta$ R1 y el TGF- $\beta$ R2, que fosforilan factores de transcripción llamados SMAD. Al unirse la citocina, la porción citoplasmática del dominio con actividad serina/treonina cinasa del TGF- $\beta$ R1 fosforila SMAD2 y SMAD3, que, formando un complejo con SMAD4, pasa al núcleo, se une a los promotores de los genes diana y regula su transcripción (Roitt, 2003; Abbas *et al.*, 2015).

El TGF- $\beta$  inhibe la activación clásica del macrófago, pero es una de las citocinas secretadas por macrófagos activados de forma alternativa. El TGF- $\beta$  también suprime la activación de otras células, como los neutrófilos y las células endoteliales. El TGF- $\beta$  desactiva los macrófagos mediante la inhibición de la producción del intermediario reactivo del oxígeno y producción de óxido nítrico, y la regulación hacia abajo de la expresión de las moléculas clase II del CMH; también aplaca el entusiasmo citotóxico tanto de los macrófagos como de las células NK activadas por interferón  $\gamma$ . Por medio de estas acciones inhibitorias, el TGF- $\beta$  controla las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Roitt, 2003; Abbas *et al.*, 2015).

Los TGF- $\beta$  son necesarios para el desarrollo óptimo de las células dendríticas y regulan la interacción entre las células dendríticas foliculares y los linfocitos B. Controlan el desarrollo y la diferenciación de estos últimos, inhibiendo su proliferación, induciendo apoptosis y estimulando la producción de anticuerpos IgA mediante la inducción de un cambio hacia ese isotipo en los linfocitos B. La IgA es el isotipo de anticuerpo principal para la inmunidad de las mucosas (Tizard, 2013; Abbas *et al.*, 2015).

#### **2.4.5. VACUNACIÓN EN LAS SUPERFICIES MUCOSAS**

Cuando se desea vacunar a los animales frente a microorganismos que producen infecciones locales, como en el tracto intestinal, que constituye la vía habitual de infección o en la que se inicia el proceso infeccioso, se debe estimular preferentemente la respuesta de IgA. Para conseguirlo, el antígeno debe ser administrado a nivel local para una protección óptima. Los antígenos inactivados generalmente no son eficaces a la hora de iniciar una respuesta de IgA, ya que se eliminan inmediatamente en el lavado gastrointestinal cuando se aplican a membranas mucosas por lo que es importante que se incorporen un nivel elevado de antígenos vacunales. La vacuna debe persistir durante suficiente tiempo como para iniciar una respuesta inmune pero sin producir daño significativo (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Tizard, 2013).

La vacunación sistémica frente a estas infecciones superficiales aporta cierto grado de inmunidad, ya que permite transferir pequeñas cantidades de IgG desde el suero hasta la superficie mucosa. De hecho, muchas vacunas disponibles actualmente simplemente estimulan niveles elevados de anticuerpos de la clase IgG en la sangre. Estos son

efectivos porque una vez que los microorganismos invasores producen daño tisular e inician una respuesta inflamatoria, el lugar de invasión se inunda por IgG. No obstante, está claro que esta no es una manera efectiva de aportar inmunidad. Sin embargo, la formación de IgA constituye el mecanismo efector principal de la respuesta inmune a nivel local, por lo que obtener una buena respuesta de IgA representa el primer objetivo de las vacunas de mucosas que puede impedir la colonización del agente y la consiguiente progresión hacia la enfermedad (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Tizard, 2013).

Los tejidos linfoides intestinales de los animales recién nacidos responden rápidamente a los antígenos ingeridos. Por ejemplo, los terneros vacunados frente a coronavirus por vía oral al nacer son resistentes a coronavirus virulentos de 3 a 9 días. De igual forma, lechones vacunados por vía oral 3 días después del nacimiento con vacunas de virus de la gastroenteritis transmisible desarrollan anticuerpos neutralizantes en el intestino entre 5 y 14 días después. Gran parte de esta resistencia precoz se atribuye a la producción innata de IFN- $\alpha/\beta$ , pero también hay una respuesta intestinal temprana de IgM que cambia a IgA a las 2 semanas (Tizard, 2013). Un estudio realizado demostró que las crías de alpacas codifican y transcriben ARNm de IgA en el epitelio intestinal desde el primer día de edad presentando una tendencia de expresión constante hasta la cuarta semana (Dionisio *et al.*, 2014).

## **2.5.REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

La PCR fue creada por Kary B. Mullis en 1983. En sus años de evolución ha contribuido de manera significativa en los procesos investigativos básicos y de diagnóstico en gran cantidad de patologías (Pinilla *et al.*, 2008).

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. El número de copias se doblan en cada ciclo dando cerca de un millón de copias en 20 ciclos ( $2^{20}$ ). Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR

(Reverse Transcription-PCR). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc, que es utilizada cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen específico de interés (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

## **2.5.1. COMPONENTES DE LA PCR**

### **2.5.1.1. Templado o molde (ADN o ADNc)**

El templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.1.2. ADN polimerasa**

La ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, considerada una enzima termoestable que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus* (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.1.3. Oligonucleótidos o primers**

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de guanina-citosina (G-C) no debe ser más del 55% de la secuencia. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada “forward” y otra “reward”; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5’-3’ (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.1.4. Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)**

Los dNTPs (adenina, timina, citosina y guanina) son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.1.5. Solución amortiguadora, ion magnesio ( $Mg^+$ ) y agua**

La solución amortiguadora que se usa en la reacción generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH=8). El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

## **2.5.2. PASOS**

### **2.5.2.1. Desnaturalización**

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de adenina-timina. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.2.2. Hibridación**

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.2.3. Extensión**

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTPs complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5'a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.5.3. PCR EN TIEMPO REAL**

El principio de la técnica se basa en la PCR convencional y el término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR convencional. Precisamente, estas características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa (Bustin *et al.*, 2005).

El monitoreo de los productos amplificados emplea el sistema basado en reporteros fluorescentes, de los cuales tenemos a los métodos no específicos, que se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente que es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El más empleado es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia. Su principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers, es por ello que se debe realizar una curva de disociación al final de la reacción para evaluar la especificidad del producto obtenido (Foy y Parkes, 2001; Zipper *et al.*, 2004; Wong y Medrano, 2005).

### **2.6. CUANTIFICACIÓN RELATIVA**

Se aplica cuando se desea evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (normalizador) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron o decrementaron los niveles de ARNm o en su caso, si no hubo cambios (Pinilla *et al.*, 2008; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

### **2.6.1. MÉTODO DE Ct COMPARATIVO**

El método de CT comparativo (método de  $\Delta\Delta CT$ ) usa las fórmulas aritméticas para lograr un resultado para la cuantificación relativa. Es posible eliminar el uso de curvas estándar y usar el método de  $\Delta\Delta CT$ , pero las eficacias de PCR entre el blanco y control (endógeno) deben ser relativamente equivalentes. La ventaja de este método es que no exige curvas estándar para cada pozo de reacción, permitiendo el ahorro de reactivos y es útil cuando hay un número alto de muestras (Pinilla *et al.*, 2008).

### **2.6.2. NORMALIZADORES**

Los normalizadores son un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento de las células; pueden ser expresados en diferentes condiciones experimentales incluyendo tejidos o células. Su expresión no debe ser muy diferente del gen blanco y la estabilidad y tamaño debe ser parecido a los genes de interés. Entre los genes normalizadores tenemos a la actina y GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), entre otros (Bustin, 2002; Pinilla *et al.*, 2008).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.Lugar de estudio**

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología sección Virología y Diagnóstico Molecular, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), ubicado en el distrito de San Borja, ciudad de Lima.

#### **3.2.Preparación del antígeno clostridial**

Los antígenos de *Clostridium perfringens* se obtuvieron de todas las cepas de campo aisladas procedentes de crías de alpacas muertas con diagnóstico de enterotoxemia durante la campaña de parición del 2014 en el distrito de Maranganí, Cusco. Se realizó tinción Gram y pruebas bioquímicas para su identificación, y esta fue sembrada en caldo tioglicolato e incubada en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 48 horas. El cultivo fue inactivado con formalina a una concentración de 0.05% por una hora y se procedió a centrifugar para separar la fase celular de la fase líquida. De la fase líquida se precipitaron las proteínas solubles totales empleando el ácido tricloroacético (TCA - Merck, USA) y se llevó a refrigeración por 24 horas. Posteriormente se centrifugó y se lavaron los restos con acetona (Merck, USA) y se procedió a centrifugar nuevamente. El precipitado de la fase líquida y celular se resuspendió en PBS y se sometió a proceso de diálisis en solución salina a 4°C. Se obtuvo finalmente una solución de antígenos somáticos más exotoxina purificada y se determinó la concentración antigénica de la muestra dializada empleando el equipo Qubit® 2.0 fluorometer (Invitrogen, USA) y el kit comercial “Qubit® protein assay kit” siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se procedió a ajustar la dosis de antígeno a 13mg/ml (More, 2013).

### **3.3. Animales para el estudio**

Se evaluaron un total de 25 crías de alpacas clínicamente sanas entre 1 y 40 días de edad, de la variedad Suri y Huacaya, de ambos sexos, provenientes del centro de crianza de alpacas de La Raya (IVITA-Maranganí) y de comunidades alpaqueras aledañas, localizadas en la provincia de Canchis, departamento de Cusco, durante el año 2015.

Los animales fueron divididos en dos grupos: un grupo de 10 crías que corresponde al grupo no tratado, que no recibió la vacuna; y otro grupo de 15 crías que corresponde al grupo tratado, que sí recibió la vacuna. Ambos grupos de animales (tratados y no tratados) al momento de la toma de muestra, fueron subdivididos en dos subgrupos: grupo 1, correspondientes a crías de 15 a 28 días de edad; y grupo 2, crías de 36 a 56 días de edad.

Para el análisis de expresión genética se incluyó a tres fetos a término de gestación durante el periodo de muestreo, este se utilizó como animal calibrador que representó el valor basal de expresión genética de los genes estudiados.

### **3.4. Protocolo de administración**

La administración consistió en la sujeción de la cría e inmediatamente se le procedió a abrirle la boca para administrarle con una jeringa por vía oral la vacuna con antígeno clostridial (13mg) diluido con suero fisiológico en un volumen total de 5ml. El protocolo comprendió la administración de dos dosis con un intervalo de 7 días entre la primera y segunda dosis. Luego de siete días posteriores a la segunda dosis se procedió a realizar la toma de muestra.

### **3.5. Toma de Muestra**

Las muestras fueron tomadas inmediatamente después de la eutanasia de los animales de estudio, los cuales fueron sacrificados mediante un protocolo aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la FMV-UNMSM. Se colectaron segmentos

intestinales de 2cm de longitud de la porción media del yeyuno de forma aséptica. Las muestras fueron inmediatamente lavadas en suero fisiológico estéril al 0.9% para eliminar restos de contenido intestinal potencialmente inhibidores de las técnicas moleculares. Luego se colocaron en crioviales estériles de 2ml de capacidad, rotulados y se conservó en nitrógeno líquido (-196°C) hasta su procesamiento.

### **3.6.Extracción de ARN total**

Para la extracción del ARN total se empleó el método combinado de “Trizol® Reagent” y el kit comercial “PureLink™ Micro-to-Midi System” (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los segmentos intestinales fueron descongelados gradualmente desde -196°C seguido de -70°C, -20°C y a 4°C. Seguidamente, se procedió a cortar y pesar 150mg del tejido intestinal, y se realizó un molido a 4°C con pilón y mortero estériles y congelados para evitar que la muestra se descongele. El molido se realizó hasta que toda la muestra se observó en forma de polvo. Se le agregó 2ml de Trizol® Reagent homogenizándolo para luego colocarlo en un vial estéril e incubando por 5 minutos. Se transfirió 1ml de la mezcla a un vial y se le agregó 200ul de cloroformo para agitarlo e incubarlo por 3 minutos. Se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C y se transfirió 400ul de la fase superior acuosa en un tubo nuevo para agregarle 400ul de etanol al 70% y mezclarlo por vórtex.

Se transfirió 400ul a un cartucho nuevo que contiene una membrana de sílica y se insertó en un tubo de colección (ambos proveídos por el kit) para centrifugarlo a 12000g por 15 segundos y se descartó el fluido y el tubo de colección reinsertándolo en un nuevo tubo de colección. Se repitió este paso nuevamente.

Se adicionó 330ul de buffer de lavado I (proveído por el kit) y se centrifugó a 12000g por 15 segundos y se descartó el fluido y el tubo de colección reinsertándolo en un nuevo tubo de colección. Se agregó 80ul del Mix ADNasa I (proveído por el kit) sobre la membrana de sílica y se incubó por 15 minutos. Se agregó 330ul de buffer de lavado I (proveído por el kit) y se centrifugó a 12000g por 15 segundos y se descartó el fluido y el tubo de colección reinsertándolo en un nuevo tubo de colección. Se repitió este paso.

Se adicionó 500ul del buffer de lavado II (proveído por el kit) y se centrifugó a 12000g por 15 segundos y se descartó el fluido y el tubo de colección reinsertándolo en un nuevo tubo de colección. Se repitió este paso nuevamente. Se centrifugó a 12000g por 1 minuto para secar la membrana de sílica con el ARN capturado y se descartó el tubo de colección y se insertó el cartucho a un tubo de recuperación de ARN (proveído por el kit). Para recuperar el ARN se agregó 100ul de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 12000g por 2 minutos. Luego se procedió a alicuotar el ARN en tubos de 600ul, cada uno con 25ul de ARN. Finalmente, se obtuvo ARN total eluído en agua libre de nucleasas y se mantuvo a -70°C hasta su uso en la síntesis de ADN complementario por RT-PCR.

### **3.7.Cuantificación de ARN total**

Se realizó la cuantificación del ARN total extraído mediante lectura por fluorimetría para conocer las concentraciones de ARN empleando el kit comercial “Quant-iT™ RNA Assay” siguiendo las instrucciones del fabricante.

En tubos de lectura de 500ul (proveído por el kit) se agregó 2ul de la muestra de ARN total extraído y 198ul de buffer de cuantificación (proveído por el kit). Se agitó por vórtex 3 segundos y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos en el equipo Qubit® 2.0 fluorometer calibrado (Invitrogen, USA), se leyeron las muestras y se homogenizaron a una concentración de 1ug de ARN total extraído.

### **3.8.Electroforesis de ARN total**

Adicionalmente, se evaluó la calidad del ARN total extraído mediante electroforesis de ARN en gel de agarosa 1% desnaturizante en buffer de corrida TBE 1X en una cámara de electroforesis horizontal (Biorad, USA) para observar la integridad del producto extraído.

En microtubos de 0.6ml se colocó 1.2ul de bromuro de etidio, se agregó 2ul de buffer de carga (Bromofenol, xilencianol y tartrazina) y se colocó 5ul de muestra de ARN total extraído. Se mezcló por pipeteo y se procedió de la misma forma para el marcador de peso molecular “TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder”. Se cargaron las mezclas en los

carriles del gel y se programó la electroforesis a 90V por 1 hora. Al final de la corrida electroforética, las bandas de ARN teñidas con bromuro de etidio fueron visualizadas en un transiluminador UV (UltraLum, USA).

### **3.9. Síntesis de ADN complementario por RT-PCR**

El ARN total extraído fue tomado como templado para la síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa (RT-PCR) empleando el termociclador Applied Biosystems® 2720 y el kit comercial “SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se preparó un master mix, de la siguiente manera:

2X RT Reaction Mix	10ul x n
RT Enzyme Mix	2ul x n
DEPC-treated water	7ul x n

\*Donde “n” significa el número de muestras a procesar.

Se colocó 19ul del master mix y 1ul de muestra (concentración de 1ug de ARN total) en tubos MJ White para termociclador con sus respectivas tapas para obtener un volumen final de reacción de 20ul. Las muestras fueron llevadas al termociclador y se programó por un solo ciclo con el siguiente protocolo: 25°C por 10 min, 50°C por 30 min, 85°C por 5 min y a 4°C indefinidamente para enfriar la muestra. Luego se añadió 1ul de RNasa H de *E. coli* (proveído por el kit), a cada pocillo y se incubó a 37°C por 20 min para destruir la molécula ARN del híbrido ARN:ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70°C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real.

### **3.10. PCR en Tiempo Real**

El ADNc obtenido en el paso anterior fue tomado como templado para la reacción de la PCR en tiempo real. Esta se realizó en el termociclador Applied Biosystems® 7500 empleando el kit comercial “SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal”

siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción utilizó la polimerasa Hot Start Taq, al agente intercalante “Sybr Green I” como fluoróforo intercalante de cadenas dobles de ADN, permitiendo de esta forma la evaluación de la amplificación “ciclo por ciclo”, y como referencia pasiva se utilizó al colorante Rox (todos proveídos por el kit).

Se emplearon los cebadores específicos para el exón 3 de la IgA y citoquinas asociadas (IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$ ). Se incluyó cebadores específicos para la amplificación de transcritos de GAPDH como gen interno para la normalización de la cuantificación relativa. Estos cebadores fueron diseñados a partir de secuencias disponibles en GenBank. Los cebadores se indican en el cuadro 1.

**Cuadro 1:** Cebadores diseñados para el exón 3 de la IgA, IL-5, IL-6, TGF- $\beta$  y GAPDH.

Gen	Longitud (pb)	Secuencia (5` - 3`)	T° de hibridación (°C)
IgA Exon3	164	F: 5`AAGGACGTGCTGGTTCGAT 3`	59.33
		R: 5`CCCACCATGCAGGAGTAGTT 3`	59.38
IL-5	200	F: 5`GATAGGCGA $\color{red}{Y}$ GGGAACTTGA 3`	60.04
		R: 5`GCCATCTT $\color{red}{Y}$ CTCCTCCACAC 3`	59.66
IL-6	197	F: 5`CCTGGTGATGGCTACTGCTT 3`	60.28
		R: 5`ACAGTGCCTCCTTGCTGTTT 3`	59.91
TGF- $\beta$	185	F: 5`GAGGTGATCT $\color{red}{Y}$ GCCACCATT 3`	59.93
		R: 5`GTCCTTGCGGAAGTCAATGT 3`	60.12
GAPDH	201	F: 5`ATCACTGCCACCCAGAAGAC 3`	60.12
		R: 5`GCACGTCAGATCCACAACAG 3`	60.32

\*Donde: pb = Pares de bases; Y = C ó T

Se preparó un master mix, de la siguiente manera:

Sybr green super mix	12.5ul x n
Cebador forward	0.5ul x n
Cebador reverse	0.5ul x n
ROX diluído (1:10)	0.5ul x n
Agua libre de nucleasas	9.0ul x n

\*Donde “n” significa el número de muestras a procesar.

Se procedió a agitar ligeramente en el vórtex de 2 a 3 segundos para homogenizar el mix. Se colocó 23ul del Master Mix de reacción en placas de PCR y se transfirió 2ul del ADNc obtenido en su pocillo respectivo. Las muestras fueron llevadas al termociclador y se programó con el siguiente protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (desnaturalización inicial y activación de la polimerasa), seguido de 45 ciclos de: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos y lectura de placa; y el análisis de temperatura de disociación desde 65°C hasta 90°C, con incrementos de temperatura de 0.3°C cada 30 segundos, y finalizando la reacción a 8°C indefinidamente para mantener los productos. La placa fue retirada del termociclador y congelada a -20°C.

Los resultados fueron evaluados a través del Software 7500 Fast Real-Time PCR Systems Version 2.0.1, obteniéndose los valores de Ct (*Cycle threshold* o ciclo umbral) para su uso en el análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  como método de cuantificación relativa y el valor de Tm (Temperatura de *melting* o disociación) de cada uno de los productos para evaluar la especificidad de los productos amplificados. Se hicieron tres repeticiones por cada muestra y su gen evaluado para obtener los promedios de Ct y Tm de cada muestra.

### 3.11. Cuantificación Relativa

Se empleó la técnica  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o Método Ct comparativo como técnica de cuantificación de la expresión relativa de genes detectables a través de RT-PCR en tiempo real (Livak y Smittdgen, 2001), la cual se basa en el análisis comparativo de los Cts de las muestras analizadas con el calibrador (en el presente estudio se utilizó a un feto como calibrador), comparados con el Ct de un control endógeno (en el presente estudio se utilizó GAPDH como control endógeno). La fórmula se presenta a continuación:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador.

$\Delta\Delta Ct$  = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador.

El análisis se realizó comparando las curvas de amplificación de los individuos tratados versus los individuos no tratados. Los resultados son presentados como cantidades en número de veces con respecto al calibrador. De esta forma se obtuvo los niveles de expresión del ARNm del exón 3 de la IgA y citoquinas asociadas (IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$ ) con respecto al calibrador.

### **3.12. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de las variables se empleó la prueba de Shapiro-Wilk concluyendo que no siguen una distribución normal, empleando por lo tanto la prueba no paramétrica U de Mann Whitney-Wilcoxon para estimar diferencias entre individuos vacunados y no vacunados. Los resultados se presentan como el promedio de los grupos evaluados. Todas las pruebas fueron realizadas en el programa estadístico Stata/SE 12.0.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Electroforesis de ARN total extraído**

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% de todas las muestras de ARN extraídas (25/25) evidenció la presencia de bandas nítidas del ARN ribosomal 28S y 18S en el gel de agarosa luego de la corrida electroforética del ARN total (Figura A-1), por lo cual se determinó que los ARN mensajeros de la muestra en estudio no está degradado y mantiene su integridad.

### **4.2. RT-PCR en tiempo real del ARNm del gen GAPDH**

Se consideraron amplificaciones para todos los genes evaluados aquellas muestras con una curva de disociación única sin presencia de productos inespecíficos y una curva de amplificación clara. Se realizó el RT-PCR en tiempo real de las muestras intestinales de las crías de alpaca tratadas (vacunadas) y no tratadas (no vacunadas), utilizando los cebadores específicos para un segmento del gen constitutivo GAPDH como control endógeno de los ARNm estudiados. El análisis mostró curvas de disociación de un pico único con una temperatura de disociación ( $T_m$ ) para las crías tratadas con un valor entre 85.98 y 86.67°C con un promedio de 86.43°C, y para las crías no tratadas entre 86.09 y 86.54°C con un promedio de 86.35°C. El análisis de las curvas de amplificación mostró un ciclo umbral ( $C_t$ ) para las crías tratadas entre 17.51 y 19.92 con un promedio de 18.89, y para las crías no tratadas entre 17.54 y 20.91 con un promedio de 19.41. Las curvas de disociación y de amplificación para el gen GAPDH en la mucosa intestinal de las crías de alpaca tratadas y no tratadas se muestran en las Figuras A-2 y A-7, y sus valores de  $T_m$  y  $C_t$  se encuentran en el Cuadro I y II, respectivamente.

### **4.3.RT-PCR en tiempo real del ARNm del gen IL-5**

Se realizó el RT-PCR en tiempo real de las muestras intestinales de las crías de alpaca tratadas (vacunadas) y no tratadas (no vacunadas), utilizando los cebadores específicos para un segmento del gen de IL-5. El análisis mostró curvas de disociación de un pico único con una temperatura de disociación ( $T_m$ ) para las crías tratadas con un valor entre 74.85 y 75.53°C con un promedio de 75.27°C, y para las crías no tratadas entre 74.81 y 75.34°C con un promedio de 75.16°C. El análisis de las curvas de amplificación mostró un ciclo umbral ( $C_t$ ) para las crías tratadas entre 29.4 y 32.06 con un promedio de 31.01, y para las crías no tratadas entre 31.18 y 33,13 con un promedio de 32.18. Las curvas de disociación y de amplificación para IL-5 en la mucosa intestinal de las crías de alpaca tratadas y no tratadas se muestran en las Figuras A-3, A-8 y A-9, y sus valores de  $T_m$  y  $C_t$  se encuentran en el Cuadro I y II, respectivamente.

### **4.4.RT-PCR en tiempo real del ARNm del gen IL-6**

Se realizó el RT-PCR en tiempo real de las muestras intestinales de las crías de alpaca tratadas (vacunadas) y no tratadas (no vacunadas), utilizando los cebadores específicos para un segmento del gen de IL-6. El análisis mostró curvas de disociación de un pico único con una temperatura de disociación ( $T_m$ ) para las crías tratadas con un valor entre 78.35 y 78.95°C con un promedio de 78.75°C, y para las crías no tratadas entre 78.2 y 78.8°C con un promedio de 78.41°C. El análisis de las curvas de amplificación mostró un ciclo umbral ( $C_t$ ) para las crías tratadas entre 24.57 y 29.09 con un promedio de 26.93, y para las crías no tratadas entre 28.14 y 30.62 con un promedio de 28.94. Las curvas de disociación y de amplificación para IL-6 en la mucosa intestinal de las crías de alpaca tratadas y no tratadas se muestran en las Figuras A-4, A-10 y A-11, y sus valores de  $T_m$  y  $C_t$  se encuentran en el Cuadro I y III, respectivamente.

### **4.5.RT-PCR en tiempo real del ARNm del gen TGF- $\beta$**

Se realizó el RT-PCR en tiempo real de las muestras intestinales de las crías de alpaca tratadas (vacunadas) y no tratadas (no vacunadas), utilizando los cebadores específicos para un segmento del gen de TGF- $\beta$ . El análisis mostró curvas de disociación de un pico único con una temperatura de disociación ( $T_m$ ) para las crías tratadas con un valor entre

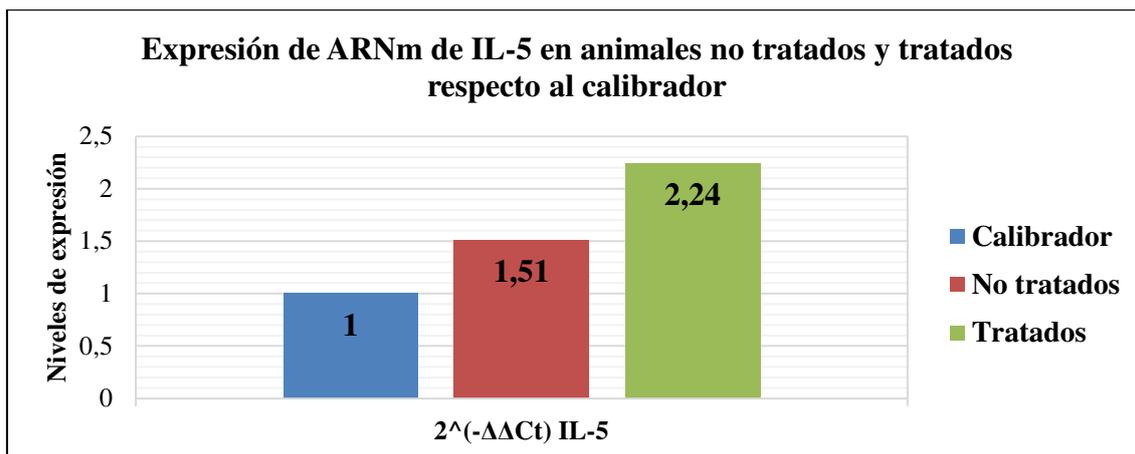
84.68 y 85.58°C con un promedio de 85.1°C, y para las crías no tratadas entre 84.39 y 84.92°C con un promedio de 84.63°C. El análisis de las curvas de amplificación mostró un ciclo umbral (Ct) para las crías tratadas entre 20.75 y 23.54 con un promedio de 22.24, y para las crías no tratadas entre 21.59 y 24.63 con un promedio de 23.51. Las curvas de disociación y de amplificación para TGF-β en la mucosa intestinal de las crías de alpaca tratadas y no tratadas se muestran en las Figuras A-5, A-12 y A-13, y sus valores de Tm y Ct se encuentran en el Cuadro I y IV, respectivamente.

#### **4.6.RT-PCR en tiempo real del ARNm del gen IgA**

Se realizó el RT-PCR en tiempo real de las muestras intestinales de las crías de alpaca tratadas (vacunadas) y no tratadas (no vacunadas), utilizando los cebadores específicos para un segmento del exón 3 del gen de IgA. El análisis mostró curvas de disociación de un pico único con una temperatura de disociación (Tm) para las crías tratadas con un valor entre 86.77 y 87.22°C con un promedio de 87.04°C, y para las crías no tratadas entre 86.8 y 87.34°C con un promedio de 87.07°C. El análisis de las curvas de amplificación mostró un ciclo umbral (Ct) para las crías tratadas entre 15.77 y 20.79 con un promedio de 18.02, y para las crías no tratadas entre 18.45 y 21.54 con un promedio de 19.84. Las curvas de disociación y de amplificación para el exón 3 de IgA en la mucosa intestinal de las crías de alpaca tratadas y no tratadas se muestran en las Figuras A-6, A-14 y A-15, y sus valores de Tm y Ct se encuentran en el Cuadro I y V, respectivamente.

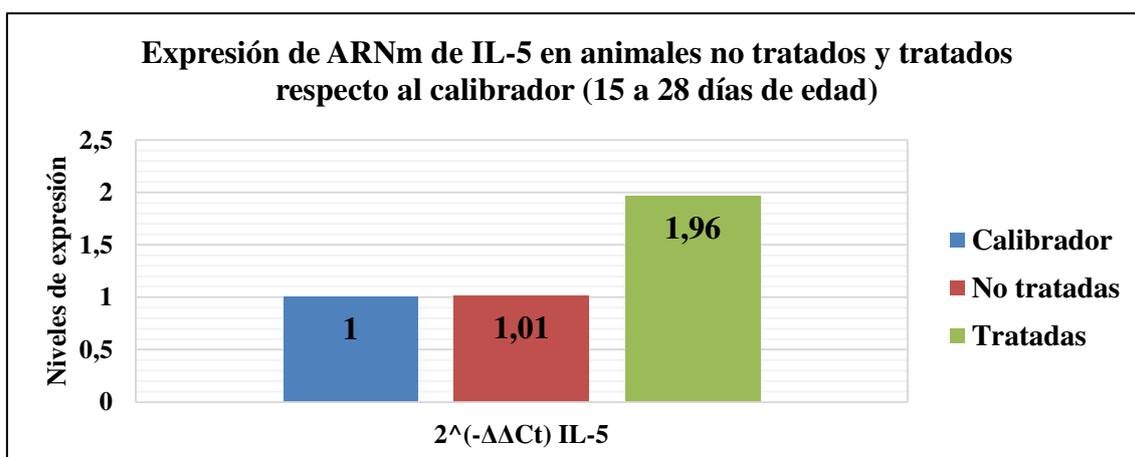
#### **4.7.Cuantificación relativa del ARNm del gen IL-5**

Los resultados del análisis de cuantificación relativa que utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mostraron que el nivel promedio de expresión de ARNm de IL-5 en el grupo de animales no tratados (no vacunados) es de 1.51 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el grupo de los animales tratados (vacunados) expresan 2.24 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 1). Estos resultados reflejan una tendencia creciente de expresión del gen de IL-5 en los animales tratados; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa de expresión entre los grupos de animales no tratados y tratados según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.0960$ ). Los datos en extenso se muestran en el cuadro II.



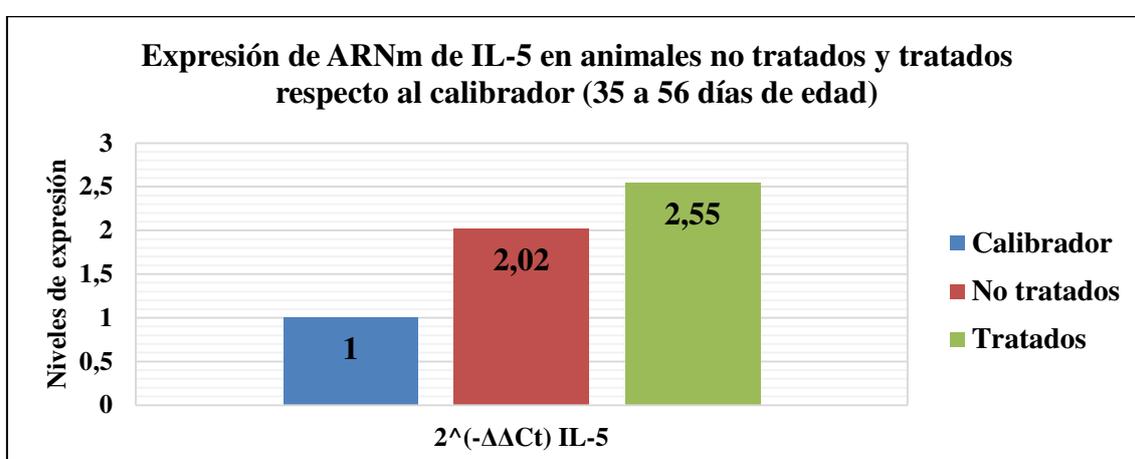
**Figura 1.** Cuantificación relativa del ARNm de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 56 días de edad).

Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 15 a 28 días de edad (3 a 4 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm de IL-5 en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 1.01 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 1.96 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 2). Estos resultados evidencian un aumento en la expresión del gen de IL-5 en animales tratados de 15 a 28 días de edad. La prueba U de Mann Whitney-Wilcoxon demuestra que la diferencia entre el subgrupo de animales no tratados y tratados es significativo ( $p=0.0192$ ).



**Figura 2.** Cuantificación relativa del ARNm de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 28 días de edad).

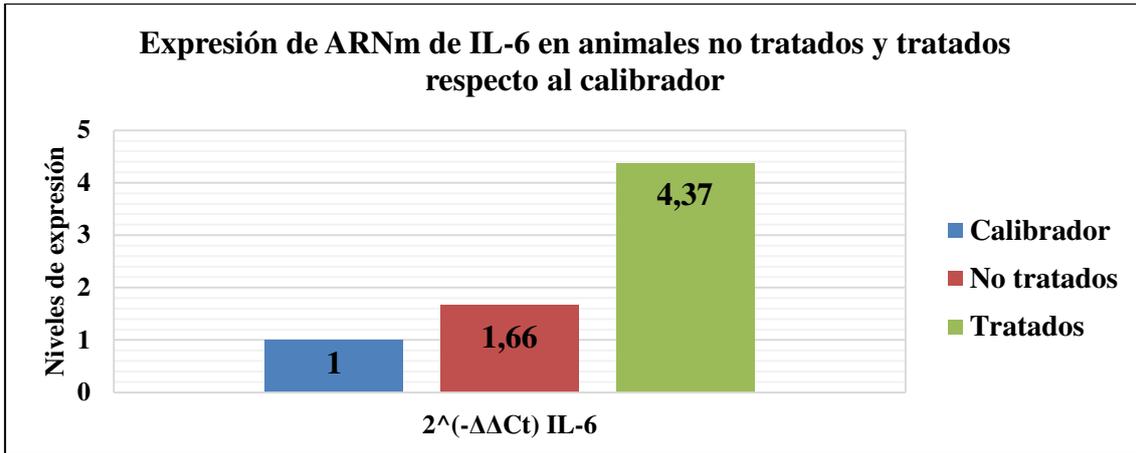
Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 36 a 56 días de edad (6 a 8 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm de IL-5 en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 2.02 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 2.55 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 3). Estos resultados manifiestan una tendencia creciente de expresión del gen de IL-5 en animales tratados de 36 a 56 días de edad; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.6842$ ).



**Figura 3.** Cuantificación relativa del ARNm de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (35 a 56 días de edad).

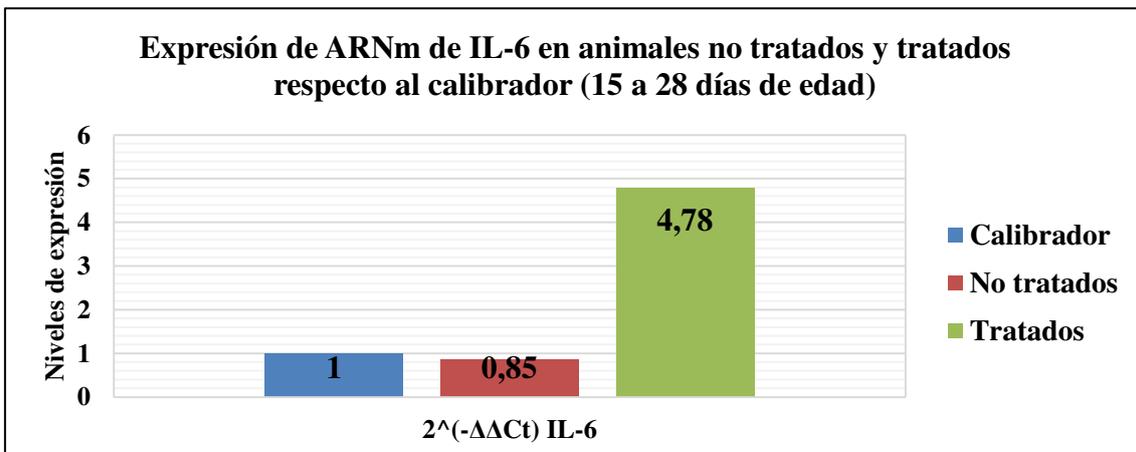
#### 4.8. Cuantificación relativa del ARNm del gen IL-6

Los resultados del análisis de cuantificación relativa que utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mostraron que el nivel promedio de expresión de ARNm de IL-6 en el grupo de animales no tratados (no vacunados) es de 1.66 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el grupo de los animales tratados (vacunados) expresan 4.37 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 4). Estos resultados reflejan una tendencia creciente de expresión del gen de IL-6 en los animales tratados; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa de expresión entre los grupos de animales no tratados y tratados según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.0522$ ). Los datos en extenso se muestran en el cuadro III.



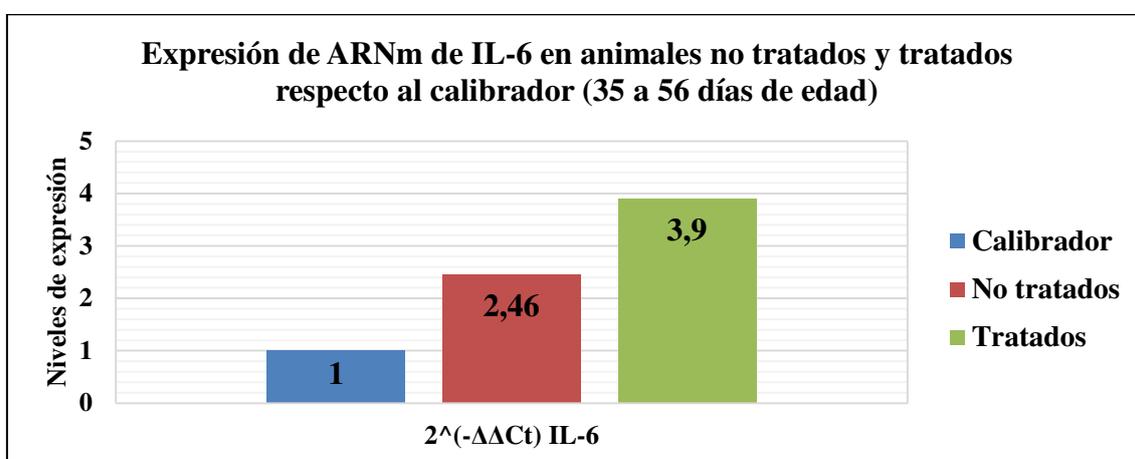
**Figura 4.** Cuantificación relativa del ARNm de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 56 días de edad).

Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 15 a 28 días de edad (3 a 4 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm de IL-6 en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 0.85 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 4.78 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 5). Estos resultados evidencian un aumento en la expresión del gen de IL-6 en animales tratados de 15 a 28 días de edad. La prueba U de Mann Whitney-Wilcoxon demuestra que la diferencia entre el subgrupo de animales no tratados y tratados es significativo ( $p=0.0128$ ).



**Figura 5.** Cuantificación relativa del ARNm de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 28 días de edad).

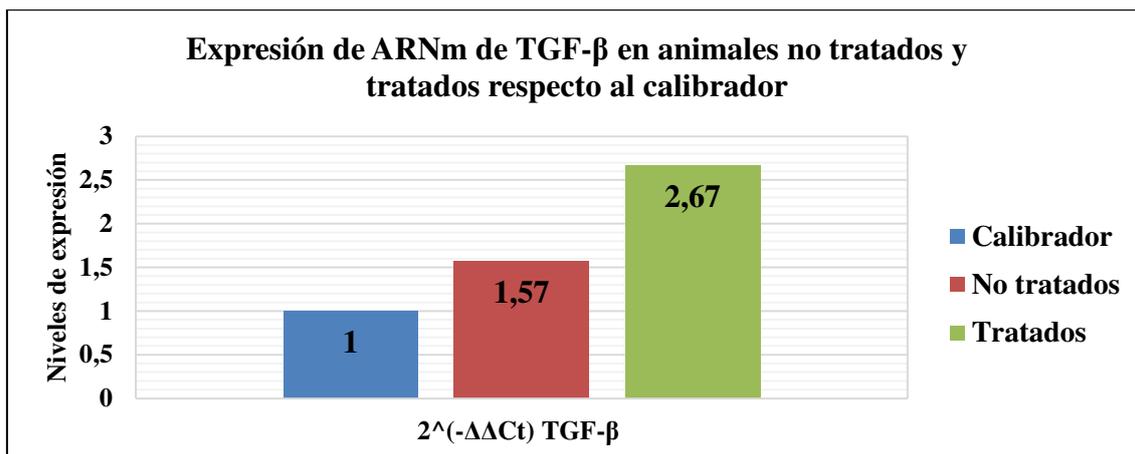
Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 36 a 56 días de edad (6 a 8 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm de IL-6 en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 2.46 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 3.90 veces lo expresado por el animal calibrador (figura 6). Estos resultados manifiestan una tendencia creciente de expresión del gen de IL-6 en animales tratados de 36 a 56 días de edad; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.9353$ ).



**Figura 6.** Cuantificación relativa del ARNm de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (35 a 56 días de edad).

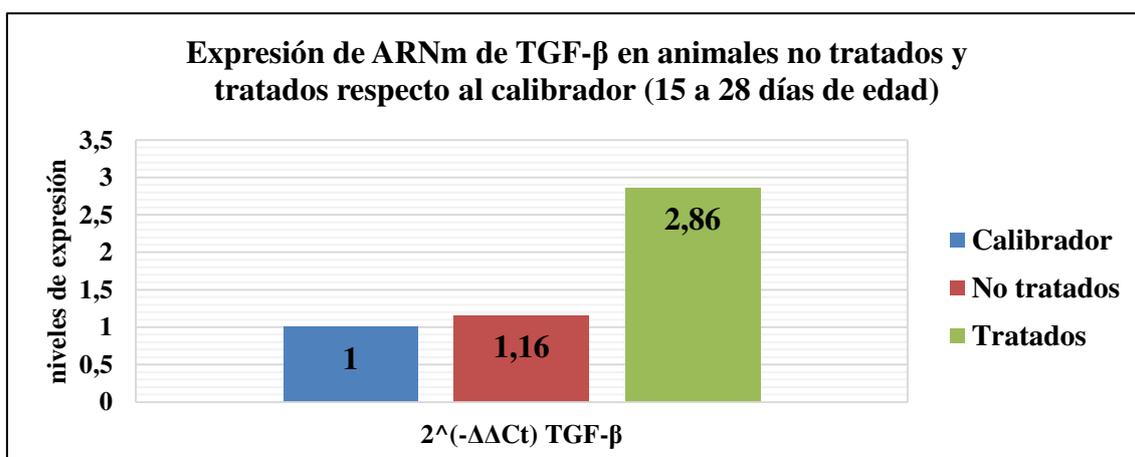
#### 4.9. Cuantificación relativa del ARNm del gen TGF-β

Los resultados del análisis de cuantificación relativa que utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , mostraron que el nivel promedio de expresión de ARNm de TGF-β en el grupo de animales no tratados (no vacunados) es de 1.57 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el grupo de los animales tratados (vacunados) expresan 2.67 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 7). Estos resultados reflejan una tendencia creciente de expresión del gen de TGF-β en los animales tratados; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa de expresión entre los grupos de animales no tratados y tratados según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.0714$ ). Los datos en extenso se muestran en el cuadro IV.



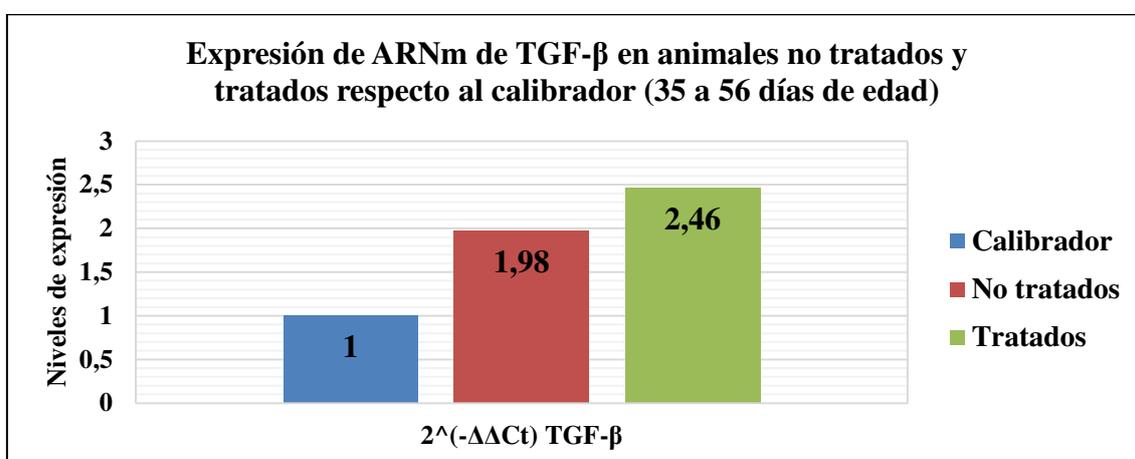
**Figura 7.** Cuantificación relativa del ARNm de TGF-β en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 56 días de edad).

Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 15 a 28 días de edad (3 a 4 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm de TGF-β en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 1.16 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 2.86 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 8). Estos resultados evidencian un aumento en la expresión del gen de TGF-β en animales tratados de 15 a 28 días de edad. La prueba U de Mann Whitney-Wilcoxon demuestra que la diferencia entre el subgrupo de animales no tratados y tratados es significativo ( $p=0.0404$ ).



**Figura 8.** Cuantificación relativa del ARNm de TGF-β en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 28 días de edad).

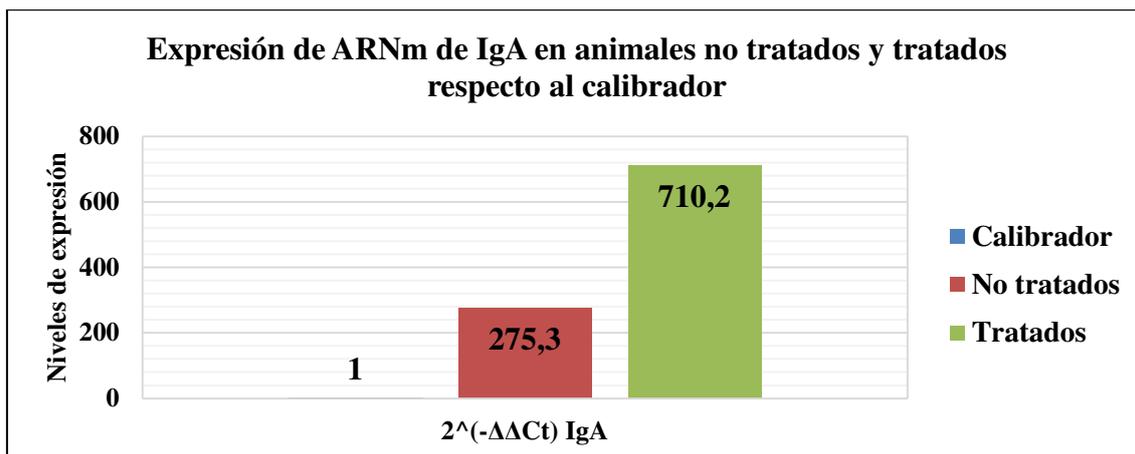
Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 36 a 56 días de edad (6 a 8 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm de TGF- $\beta$  en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 1.98 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 2.46 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 9). Estos resultados manifiestan una tendencia creciente de expresión del gen de TGF- $\beta$  en animales tratados de 36 a 56 días de edad; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.5698$ ).



**Figura 9.** Cuantificación relativa del ARNm de TGF- $\beta$  en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (35 a 56 días de edad).

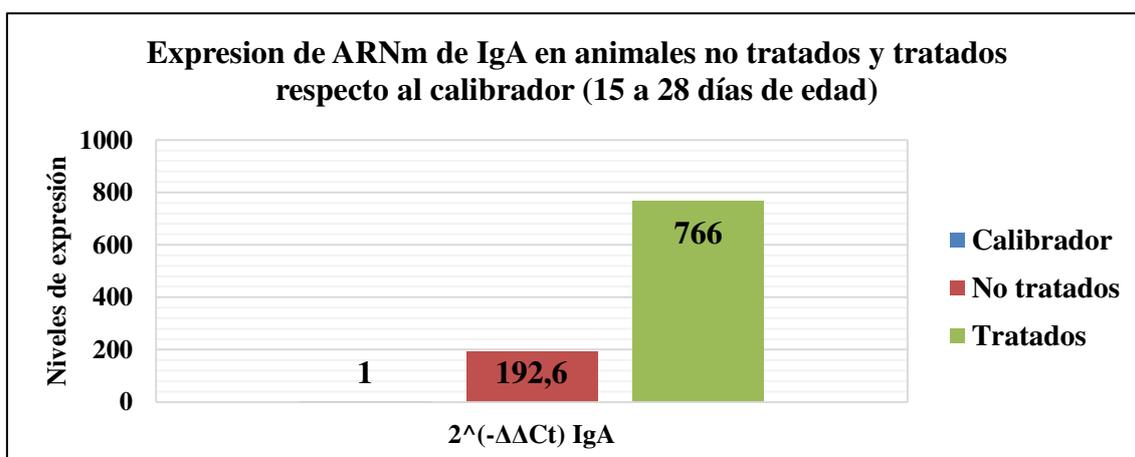
#### 4.10. Cuantificación relativa del ARNm del gen IgA

Los resultados del análisis de cuantificación relativa que utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm del exón 3 de IgA en el grupo de animales no tratados (no vacunados) es de 275.3 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el grupo de los animales tratados (vacunados) expresan 710.2 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 10). Estos resultados demuestran un aumento en la expresión del gen de IgA en los animales tratados (vacunados con antígeno clostridial). La prueba U de Mann Whitney-Wilcoxon indica que la diferencia entre el grupo de animales no tratados y tratados es significativo ( $p=0.0055$ ). Los datos en extenso se muestran en el cuadro V.



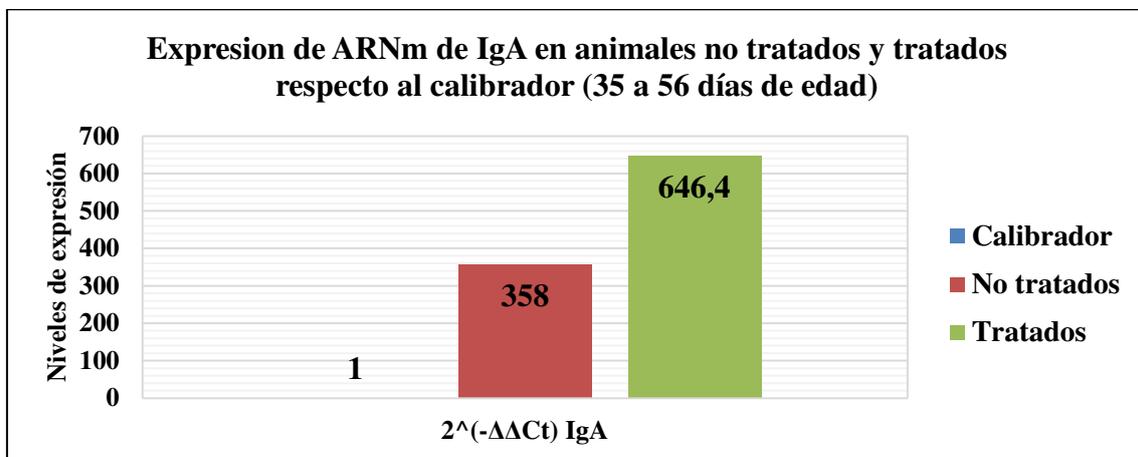
**Figura 10.** Cuantificación relativa del ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 56 días de edad).

Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 15 a 28 días de edad (3 a 4 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm del exón 3 de IgA en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 192.6 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 766.0 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 11). Estos resultados evidencian un aumento en la expresión del gen de IgA en animales tratados de 15 a 28 días de edad. La prueba U de Mann Whitney-Wilcoxon demuestra que la diferencia entre el subgrupo de animales no tratados y tratados es significativo ( $p=0.0192$ ).



**Figura 11.** Cuantificación relativa del ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (15 a 28 días de edad).

Considerando el análisis por el subgrupo de animales de 36 a 56 días de edad (6 a 8 semanas); los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión del ARNm del exón 3 de IgA en el subgrupo de animales no tratados (no vacunados) es de 358 veces lo expresado por el animal calibrador. Por el contrario, el subgrupo de los animales tratados (vacunados) expresan 646.4 veces lo expresado por el animal calibrador (Figura 12). Estos resultados manifiestan una tendencia creciente de expresión del gen de IgA en animales tratados de 36 a 56 días de edad; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa según la prueba de U de Mann Whitney-Wilcoxon ( $p=0.1675$ ).



**Figura 12.** Cuantificación relativa del ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas respecto al calibrador (35 a 56 días de edad).

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinaron los niveles de expresión del ARNm del exón 3 de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  en muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas clínicamente sanas de las cuales un grupo no recibió vacuna y otro grupo si recibió vacuna con antígeno clostridial por vía oral en doble dosis, para revelar si estos antígenos proteicos producen un estímulo y activación a una respuesta inmune humoral a nivel de la mucosa intestinal, utilizando la técnica RT-PCR en tiempo real, ya que las cantidades de estas moléculas son tan bajas que las técnicas disponibles como ELISA no son lo suficientemente sensibles para detectarlas (Quereda, 2009).

En los animales muestreados se realizó las extracciones de ARNm de las muestras de intestino de los animales tratados y de los animales que no recibieron tratamiento, para evaluar el efecto del antígeno clostridial administrado en cada subgrupo en comparación con los no tratados. En primer lugar se realizó una electroforesis del ARN extraído del total de las muestras, resultado que evidenció la presencia de bandas nítidas del ARN ribosomal 28S y 18S estimando así la calidad e integridad del ARN extraído. El estudio de la integridad por electroforesis es el complemento al análisis integral de cantidad y calidad del ARN, necesario para llevar a cabo la transcripción inversa y las posteriores PCRs de manera exitosa (Díaz-Alonso *et al.*, 2013). A su vez, se determinó la expresión del gen GAPDH, la cual sirvió para estimar la viabilidad de las muestras, y además, para la normalización de las muestras en el proceso de cuantificación relativa. Los resultados mostraron una homogeneidad en las curvas de amplificación y presencia de un solo pico en el gráfico de la curva de disociación obtenida para todas las muestras analizadas comprobando de ese modo la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (Pinilla *et al.*, 2008).

El análisis de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) de los productos obtenidos de la RT-PCR tiempo real para el gen de IL-5 del grupo de animales no tratados identificó la presencia de un solo pico en el gráfico de  $T_m$  cercanas entre sí y sin mayor variación entre los amplicones resultantes (74.81 a 75.34°C) que indica la presencia de un producto único al final de la reacción. Del mismo modo, para el grupo tratado, las  $T_m$  (74.85 a 75.53°C) demostraron que existe un sólo producto de ARNm.

En el análisis de la temperatura de disociación de los productos obtenidos de la RT-PCR tiempo real para el gen de IL-6 de los animales que no recibieron tratamiento, identificó  $T_m$  cercanas entre sí y sin mayor variación entre los amplicones resultantes (78.2 a 78.8°C) que muestra la presencia de un producto único al final de la reacción. Así mismo, para el grupo tratado, las  $T_m$  (78.35 a 78.95°C) indicaron que existe un sólo producto de ARNm. Un estudio similar en tejido intestinal de crías de alpacas encontró temperaturas de disociación con un promedio de 78.5°C usando los mismos cebadores para IL-6 (Hinostroza, 2012), que corresponde a los hallados en el presente estudio.

Para el análisis de la temperatura de disociación de los productos obtenidos de la RT-PCR tiempo real para el gen de TGF- $\beta$  del grupo de animales no tratados, identificó  $T_m$  cercanas entre sí y sin mayor diferenciación entre los amplicones resultantes (84.39 a 84.92°C) que indica la presencia de un producto único al final de la reacción. De igual manera, para el grupo que recibió tratamiento, las  $T_m$  (84.68 a 85.58°C) demostraron que existe un sólo producto de ARNm. Otro estudio encontró temperaturas de disociación para TGF- $\beta$  en un rango de 84.80 a 85.70°C en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas utilizando los mismo cebadores (Herrera, 2012). Estos resultados nos demuestran una semejanza en los productos obtenidos.

En el caso del análisis de la temperatura de disociación de los productos obtenidos de la RT-PCR tiempo real para el gen del exón 3 de IgA del grupo de animales no tratados, evidencio  $T_m$  cercanas entre sí y sin mayor variación entre los amplicones resultantes (86.8 a 87.34°C) indicando la presencia de un producto único al final de la reacción. A su vez, para el grupo tratado, las  $T_m$  (86.77 a 87.22°C) demostraron que existe un sólo producto de ARNm. En otro estudio similar se encontró  $T_m$  de 85.7 a 86°C en crías de alpacas sanas y enfermas, esto debido a que emplearon para su estudio cebadores para el exón 1 de IgA (Dionisio, 2012).

En la evaluación por grupos observamos que en la expresión del gen de IL-5 no encontramos diferencia ( $p=0.0960$ ) entre los individuos tratados y no tratados, pero si se evidencia un aumento a favor de los animales tratados. Esto está influenciado por los niveles de expresión hallados para el caso del subgrupo de 6-8 semanas donde se encontró un aumento pero no significativo ( $p=0.6842$ ) por el tratamiento. Estos resultados se pueden deber a la presencia de parásitos intestinales en animales de este subgrupo que corresponde a las crías de mayor edad, ya que la IL-5 es la citocina más específica en la diferenciación y liberación de los eosinófilos periféricos y tisulares, importante en la regulación de las enfermedades gastrointestinales parasitarias causadas por tremátodos, céstodos y nemátodos e inclusive giardia (Fontanele *et al.*, 2006). Del mismo modo, es probable que infecciones por eimerias u otros protozoarios en crías de alpacas también causen este aumento de IL-5.

En el análisis para el subgrupo de 3-4 semanas encontramos que los niveles de expresión de IL-5 se ven influenciados positivamente debido al tratamiento ( $p=0.0192$ ), es decir, los niveles de expresión se incrementan; esto se puede deber, ya que la IL-5 es identificada como factor importante en la producción de IgA producida por la célula B, ayudando en la diferenciación de estas para plasmocitos, y está se encuentra distribuida en la lámina propia del intestino generando una distribución de IgA secretoria. Así mismo, estudios *in vivo* hechos en ratones deficientes en IL-5 revelaron una reducción significativa en la concentración de IgA intestinal en comparación con los que si producen IL-5 que si son capaces de mantener una respuesta normal de IgA ante un estímulo (Fontanele *et al.*, 2006). Estudios *in vitro* en lechones de 28 días demostraron una mayor expresión de ARNm de IL-5 en nódulos linfáticos 24 horas después de ser estimuladas con un antígeno viral (Quereda, 2009). Es probable que en este subgrupo de crías, un aumento de IL-5 estaría contribuyendo directamente en la síntesis de IgA.

En la evaluación por grupos encontramos que en la expresión de IL-6 no existe diferencia ( $p=0.0522$ ) entre los individuos tratados y no tratados, pero si observamos un aumento en la expresión en los animales que si recibieron el tratamiento. Esto es debido a causa de los resultados obtenidos en el subgrupo de 6-8 semanas, en los cuales no se encontró diferencia significativa (0.9353), pero si una mayor expresión. Este aumento probablemente se deba ya que a esta edad las crías ya poseen un complejo y dinámico ecosistema bacteriano intestinal y por lo tanto un mayor número de células plasmáticas

a lo largo del intestino, y es probable que haya estado expuesto al contacto con el lipopolisacárido, componente de la pared bacteriana de bacterias gram negativas, generando un potente estímulo local para la producción de IL-6 (Chiok, 2012). Las células epiteliales intestinales están activamente involucradas en la regulación de los eventos de inflamación intestinal modulando de ese modo los eventos iniciales de la respuesta inmune adquirida mediante secreción de mediadores pro y anti inflamatorios tales como la IL-6. Estudios a partir de ratones, han demostrado que la IL-6, actúa principalmente como citoquina anti-inflamatoria y atenúa la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias con reducido efecto sobre la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  (Hinostroza, 2012).

En el análisis por subgrupos hallamos que los niveles de expresión de IL-6 para el subgrupo de 3-4 semanas se ven afectados positivamente debido al tratamiento ( $p=0.0128$ ), es decir, los niveles de expresión se aumentan significativamente. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en camellos bactrianos que usando una vacuna contra brucella, obtuvo 2 semanas después, niveles de expresión de ARNm de IL-6 en los vacunados, 4.1 veces los niveles de los controles (Odbileg *et al.*, 2008). Estos resultados evidencian un aumento en la expresión de IL-6 probablemente debido a la acción de los inmunógenos administrado en la vacuna, promoviendo de esta manera la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimulando la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B para combatir principalmente a patógenos extracelulares.

En la evaluación por grupos encontramos que en la expresión de TGF- $\beta$  no existe diferencia estadística ( $p=0.0714$ ) entre los individuos tratados y no tratados, pero si se puede apreciar un aumento en la expresión. Del mismo modo para el subgrupo de 6-8 semanas, los niveles de expresión no se ven afectados ( $p=0.5698$ ) por el tratamiento, pero sin embargo también se observa un aumento. Se conoce que el TGF- $\beta$  controla las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Roitt, 2003), y en vista de los procesos inflamatorios provocados por estímulos masivos y constantes de las bacterias comensales intestinales y los antígenos alimentarios, el mecanismo de regulación es crucial en la inmunidad de mucosa intestinal la cual requiere de la participación de TGF- $\beta$  (Chiok, 2012). Entonces el nivel de expresión detectado en estas crías no vacunadas sea producto de un estado fisiológico normal a esta edad.

En el análisis por subgrupos encontramos que los niveles de expresión de TGF- $\beta$  para el subgrupo de 3-4 semanas, estos se ven influenciados positivamente debido al tratamiento ( $p=0.0404$ ), es decir, los niveles de expresión se ven aumentados. Un estudio similar encontró niveles de expresión de TGF- $\beta$  en crías sanas cercanas a los valores obtenidos en el presente trabajo (Herrera, 2012), lo que nos indica un valor de expresión normal de esta citoquina en animales sanos. La producción y secreción de muchas citoquinas tales como TGF- $\beta$  son regulados por la vitamina A y sus metabolitos, como el ácido retinoico, el cual es considerado una señal reguladora clave en inducir la tolerancia inmune intestinal, a través de la estimulación en la expresión de TGF- $\beta$  (More, 2013). Esta citoquina a su vez contribuye en la generación de células T reguladoras la cual representa un sistema de regulación de respuesta frente a antígenos presentados por CPA en la mucosa intestinal. Entonces este aumento significativo de esta citoquina estaría jugando un rol importante además, al estimular la producción de IgA, que es el anticuerpo principal necesario para la inmunidad de las mucosas, mediante la inducción de un cambio hacia ese isotipo en los linfocitos B (Abbas *et al.*, 2015).

En la evaluación por grupos encontramos que en la expresión del exón 3 de IgA existe diferencia estadística ( $p=0.0055$ ) entre los individuos tratados y no tratados, del mismo modo que para el análisis del subgrupo de 3-4 semanas donde encontramos que los niveles de expresión están influenciados positivamente por el tratamiento ( $p=0.0192$ ), es decir, los niveles de expresión se incrementan notablemente por estimulación del inmunógeno. Un estudio similar la cual evaluó la cinética de expresión del exón 1 de IgA en crías de alpacas sanas y enfermas encontró niveles de expresión menores a los obtenidos en el presente estudio esto debido al tipo de exón estudiado (Dionisio, 2012), sin embargo nos muestra un aumento de expresión de IgA de los enfermos en 3.6 veces lo expresado por los sanos, lo que extrapolando con nuestros datos obtenidos encontramos que en nuestro resultado hallado, los animales vacunados expresan 4 veces lo obtenido por los animales sanos para el caso de las crías de 3-4 semanas, demostrando una equidad de expresión de IgA en los animales vacunados en comparación con animales enfermos. Es conocida que la IgA secretoria participa en la inmunidad local a nivel de la mucosa intestinal y es la única inmunoglobulina que evita la penetración de antígenos, teniendo como función primaria aglutinarlos en el epitelio, formando complejos que previenen el desarrollo de respuestas inmunológicas adversas.

Evidencias sugieren que este anticuerpo a su vez, reduce la capacidad de adhesión de trofozoítos a las células del epitelio intestinal siendo implicado el sistema inmune secretorio en este proceso (Fontenele *et al.*, 2006). Estas diferencias de expresión de los genes de IgA encontrados en el presente estudio revelan estimulación y activación de la respuesta humoral a nivel intestinal de las crías vacunadas promovido por la acción del inmunógeno administrado en las crías desarrollando una protección de las mucosas mediante esta inmunoglobulina.

Para el caso del subgrupo de 6-8 semanas, los niveles de expresión del exón 3 de IgA no se ven afectado ( $p=0.1675$ ) por el tratamiento, pero si presentan un aumento en su expresión, y esto puede deberse al factor de la edad de estos animales evaluados. Los altos niveles de ARNm de IgA en estos animales no tratados podrían estar relacionadas a que con el paso de las primeras semanas de vida el sistema inmune de mucosas a nivel intestinal se enfrenta continuamente a microorganismos del medio ambiente presentes en suelo, pasturas o pezones contaminados de la madre. Así mismo, desde la segunda a tercera semana de edad ya el animal empieza a consumir pasturas que conlleva a un cambio de la microflora intestinal, activando una respuesta inmune de mucosa tanto innata como adaptativa poniendo en marcha mecanismos madurativos y adaptativos para mantener una barrera mucosa intestinal íntegra y activa e incorporar una población bacteriana normal estable (Dionisio, 2012), correlacionándose con estos niveles de expresión encontrados en este subgrupo de crías no tratadas.

Los resultados obtenidos del presente estudio empleando la RT-PCR en tiempo real permiten establecer que el tratamiento empleado en los individuos tratados con el antígeno clostridial ejerció un efecto estimulante sobre la expresión de los genes de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  en los animales de 3 a 4 semanas de edad. Se conoce que luego del contacto inicial con el antígeno en los sitios inductivos, los linfocitos T y B se activan, proliferan y diferencian para migrar a distintos sitios efectores como la lámina propia, o el epitelio intestinal, en el que se sitúa una población única de linfocitos intraepiteliales. De este modo, este inmunógeno administrado estaría modulando estos eventos. Los linfonódulos mesentéricos son los mayores del organismo y los primeros en desarrollarse embriológicamente y se ha determinado que a pocas horas de la administración oral de antígenos, estos se localizan en estos linfonódulos mesentéricos (Porporatto *et al.*, 2007). Un estudio determinó que las placas

de peyer ileales en crías de alpacas recién nacidos están más desarrolladas que las yeyunales, lo que permite sugerir que existe un desarrollo de estas placas en la etapa fetal y que están van decreciendo con el tiempo en la etapa postnatal, mientras que las placas de peyer yeyunales se desarrollan y son más activas post nacimiento. Estos estudios indican que las crías podrían responder a los estímulos por el inmunógeno en edades tempranas. Con la edad se presenta un incremento de linfocitos intraepiteliales e incremento en el área linfoide en las placas de peyer yeyunales (Roca, 2011). Son estos sitios del GALT donde se localiza el 80% de las células B activadas del organismo, y un 80 a 90% de estas se diferencian a células plasmáticas productoras de IgA (Porporatto *et al.*, 2007). Las citoquinas que favorecen la liberación de IgA a nivel intestinal son el TGF- $\beta$ , que media el cambio de isotipo de IgA durante el desarrollo y la activación de los linfocitos B, la IL-6, que es un agente inductor de la proliferación de IgA, secretada por las poblaciones de células B, y la IL-5 que interviene en la diferenciación de linfocitos B a plasmocitos. En el presente estudio se encontró un aumento de estas tres citoquinas claves para la producción de IgA, lo cual queda confirmada con la detección aumentada de los niveles de expresión para IgA usando la doble dosis de antígeno clostridial en estas crías.

La razón principal para usar una vía mucosa de la vacunación es que la mayoría de las infecciones afectan o parten de una superficie mucosa, y que en estas infecciones, la aplicación tópica de una vacuna es a menudo necesaria para inducir una respuesta inmune protectora. Para su desarrollo requiere de la entrega eficiente del antígeno y de sistemas de adyuvantes (Holmgren and Czerkinsky, 2005). Se tiene conocimiento que el ácido retinoico promueve la producción de IgA y es importante para el alojamiento del linfocito B en el intestino (Abbas *et al.*, 2015), al igual que estudios realizados evaluando respuesta inmune humoral y celular demostraron que la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales ejerció un efecto estimulante sobre la respuesta Th1 (More, 2013). Un estudio en ratones empleando probióticos logro aumentar la secreción de IgA en respuesta a enteropatógenos, incrementando no solo las células que expresan en intestino, sino también en bronquios y tejido de glándulas mamarias. Así mismo, se observó un incremento de linfocitos en la lámina y presencia de extensas placas de Peyer con capacidad de captación de antígenos (Costamagna *et al.*, 2008). En investigaciones utilizando el polisacárido quitosano como sistema de transporte de vacunas debido a sus propiedades mucoadhesivas naturales, han logrado interacciones

con el epitelio intestinal incrementando el transporte paracelular, estimulando un incremento de citoquinas y aumentando la captación de antígenos del lumen, e induciendo mayores niveles de IgA (Porporatto *et al.*, 2007). Un estudio demostró que empleando la toxina del cólera y la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* estos actuaron como potentes adyuvantes de la mucosa cuando se coadministra con antígenos, induciendo un rápido movimiento de células dendríticas a los folículos asociados al epitelio en las placas de Peyer (Anosova *et al.*, 2008). En el presente estudio es probable que el uso de antígenos clostridiales haya actuado del mismo modo que los adyuvantes en otras vacunas generando un fuerte estímulo a nivel de los sitios inductores de la mucosa propiciando un aumento en la respuesta inmune de mucosas.

En los animales sanos no tratados se encontró niveles de expresión de estos genes estudiados que indicaría una expresión normal en estas crías debido al estímulo de la flora normal y una baja carga de posiblemente patógenos que no evidencian una enfermedad. En un estudio realizado en crías de alpacas aparentemente sanas demostró la presencia de especies de *Eimeria* incrementándose esta infección parasitaria con la edad hallando un mayor porcentaje de infección después de la quinta semana edad (Rosadio *et al.*, 2012). En los animales tratados los niveles de expresión de estos genes evaluados fueron mayores al de las crías no tratadas, pero con significancia para el subgrupo de 3-4 semanas, esto debido a que la administración por vía oral del antígeno clostridial conduce a una eficiente respuesta del sistema inmune adquirido de tipo humoral a nivel de mucosa intestinal.

Un significativo aumento de la expresión de IgA provee una línea de defensa muy importante contra la invasión de agentes patógenos, que ingresando por vía digestiva, asedian constantemente al organismo. Es por ello que en base a los resultados obtenidos mediante el uso de esta vacuna oral, concluimos que es propicio vacunar a las crías dentro de los primeros 14 días después del nacimiento y en doble dosis para generar una protección eficaz en las edades de mayor vulnerabilidad contra la enterotoxemia.

## VI. CONCLUSIONES

- ❖ Las crías de alpaca vacunadas presentan niveles de expresión de ARNm del gen del exón 3 de IgA significativamente superiores a los animales no vacunados en 710.2 veces en promedio con respecto al calibrador.
- ❖ El uso del antígeno clostridial como vacuna oral aplicada a doble dosis en crías de alpacas durante los primeros 14 días de nacido promueve una mayor expresión significativa de los genes de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  entre la tercera y cuarta semana de edad, en comparación con las no vacunadas.
- ❖ Las crías de alpacas vacunadas después de los 21 días de nacido a doble dosis genera una mayor pero no significativa expresión de genes de IgA y citoquinas asociadas IL-5, IL-6 y TGF- $\beta$  entre la sexta y octava semana de edad, en comparación con las no vacunadas.

## VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2015. Inmunología celular y molecular. 8<sup>va</sup>.ed. España: Elsevier. 537pp.
2. Ameghino E, DeMartini J. 1991. Mortalidad en crías de alpacas. Lima: Martegraf. 128pp.
3. Anosova NG, Chabot S, Shreedhar V, Borawski JA, Dickinson BL, Neutra MR. 2008. Cholera toxin, *E. coli* heat-labile toxin, and non-toxic derivatives induce dendritic cell migration into the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Mucosal Immunol* 1 (1): 59-67.
4. Boehringer M. 1995. PCR applications manual. Germany: GmbH Biochemica. 194pp.
5. Bokaya P, Marinaro M, Jackson R, Menon S, Kiyono H, *et al.* 1999. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J. Immunol* 162 (1): 122-128.
6. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 34: 597-601.
7. Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39.
8. Bustinza AV. 2001. La alpaca: conocimiento del gran potencial andino. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 496pp.
9. Chiok KL. 2012. Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (Inf $\gamma$  e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 126pp.
10. Costamagna A, Fuentes M, Fabro A, Reus V, Benmelej A, Giugni MC, *et al.* 2008. Expresión de inmunoglobulina A y proliferación celular en intestino de ratones alimentados con leche SanCorBio. *Revista FABICIB* 12: 47-55.

11. Cummings J, Antoine J, Azpiroz F, Bourdet R, Brandtzaeg P, Calder P *et al.* 2004. Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition* 43 (2): 118-173.
12. De Genst E, Saerens D, Myldermans S, Conrath K. 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Dev Com Immunol* 30: 187-198.
13. De Simone E, Saccodossi N, Ferrari A, Leoni L, Leoni J. 2006. Immunochemical analysis of IgG subclasses and IgM in South American camelids. *Small Rumin Res* 64: 2-9.
14. Díaz-Alonso C, Garrote HS, Amor AM, Suárez YG, González RM. 2013. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 29 (3): 298-303.
15. Dionisio J. 2012. Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 61pp.
16. Dionisio JC, Manchego AS, Chiok KL, Sandoval NC, More JB, Pezo DC, Rivera HG. 2014. Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Perú: *Rev Inv Vet* 25 (2): 151-161.
17. Ebert, E. 1990. Intra-epithelial lymphocytes: interferon-gamma production and suppressor/cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol* 82: 81-85.
18. Ellis R. 2006. *Clostridium perfringens* enteritis. In: Hoffman E, ed. *The complete alpaca book*. 2ª Ed. California: Bonny Doun Press. pp. 464-467.
19. Fagarasan S, Honjo T. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology* 3 (1): 63-72.
20. Fernández-Baca S. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
21. Flodr H, Wheeler JC, Krüger PD, Olazábal JL, Rosadio RA. 2012. Pruebas de campo para evaluar calidad calostrual en la alpaca. Perú: *Rev Inv Vet* 23 (3): 307-316.
22. Fontenele AL, Carvalho PG, Ferreira CH, Girão AB, Teixeira MJ, Queiroz JÁ, Almeida YM. 2006. Avaliação da dosagem de interleucina-5 e imunoglobulina E em pacientes com giardíase com ou sem eosinofilia. *RBAC* 38 (3): 201-206.
23. Fowler ME. 1998. *Medicine and surgery of South American camelids*. 2da ed. Iowa: State University Press. 560pp.

24. Foy CA, Parkes HC. 2001. Emerging homogeneous DNA - based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem* 47: 990-1000.
25. Garmendia AE, Palmer GH, DeMartini JC, McGuire TC. 1987. Failure of passive immunoglobulin transfer: a major determinant of mortality in newborn alpacas. *Am J Vet Res* 48: 1472-1476.
26. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2002. *Immunology* 5<sup>a</sup> Ed. London: W.H. Freeman Publishers. 603pp.
27. Gómez-Lucía E, Blanco MM, Doménech A. 2007. *Manual de inmunología veterinaria*. España: Pearson Educación SA. 698pp.
28. Herrera AR. 2012. Detección de citoquinas inductora y efectora para la diferenciación y función de linfocitos colaboradores 17 (Th17) en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 98pp.
29. Hinostroza RL. 2012. Expresión de citoquinas pro inflamatorias de leucocitos de alpaca (*Vicugna pacos*) inducidos por el extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 63pp.
30. Holmgren J, Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 11 (4): S45-S53.
31. Huber S, Esplugues E, Flavell RA. 2011. TGF-beta and Th17 cells. In: Jiang S, ed. *Th17 cells in health and disease*. London: Springer Science. pp. 41-46.
32. Hurtado JF. 2011. La enterotoxemia en alpacas: Algunos aspectos etiológicos y clínicos. Lima: Sirivs. 15pp.
33. Husband AJ. 2002. Mucosal memory - maintenance and recruitment. *Veterinary immunopathology* 87: 131-136.
34. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2003. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5a Ed. London: Garland Publishing. 910pp.
35. Janeway CA Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20 (1): 197-216.
36. Janeway CA Jr. 2002. How the immune system protects the host from infection. *Microbes infect* 3: 1167-1171.
37. Jiménez PC, Espada MC, Vázquez CM. 2010. Camélidos sudamericanos: clasificación, origen y características. *RCCV* 4 (1): 23-36.

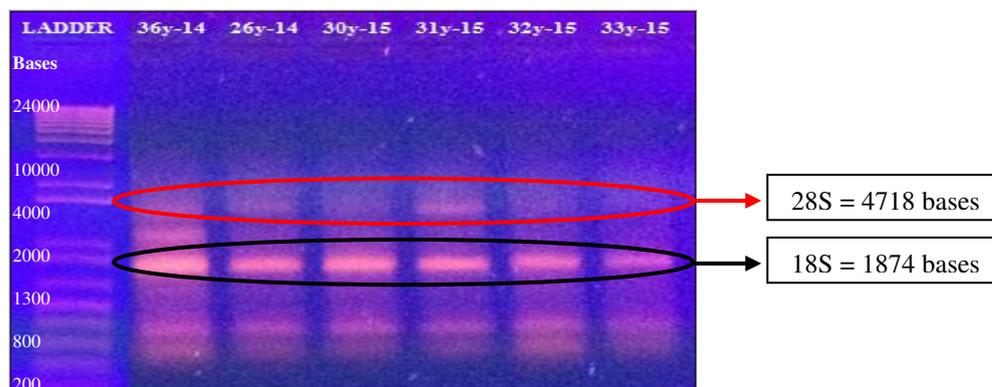
38. Kadwell M, Fernández M, Stanley H, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc R Soc Lond B* 268: 2575-2584.
39. Lefrancois L, Masopust D. 2002. T cell immunity in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Curr Opin Immunol* 14: 503-508.
40. Lorentz A, Schwengberg S, Mierke C, Manns MP, Bischoff S. 1999. Human intestinal mast cell produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross-linking and in vivo in the course of intestinal inflammatory disease. *Eur J Immunol* 29: 1496-1503.
41. Luna L. 2009. Genotipificación de cepas de *Escherichia coli* aislados de casos de diarrea en crías de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 70pp.
42. Macpherson AJ, Uhr T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303: 1662-1665.
43. Martín EC, Pinto JC, Cid VM. 2010. Camélidos sudamericanos: Estado sanitario de sus crías. *RCCV* 4 (1): 37-50.
44. Mayer L. 2003. Mucosal Immunity. *Pediatrics* 111(6): 1595-1600.
45. Melo M. 1997. Sistemas de control y manejo sanitario de alpacas y llamas en la región andina del sur peruano. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 123pp.
46. MINAGRI. 2015. En el día nacional de la Alpaca. Lima, 31 de julio de 2015. <http://www.minagri.gob.pe/portal/publicaciones-y-prensa/13311-en-el-dia-nacional-de-la-alpaca-el-minagri#page> (Accedido el 17 de septiembre del 2015).
47. More J. 2010. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos ( $\alpha$ - y  $\beta$ -defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 83pp.
48. More J. 2013. Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 104pp.
49. Moro M. 1987. Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. Lima: *Rev. Camélidos Sudamericanos* 4: 8-13.
50. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. Microbiología médica. 6ª ed. Barcelona: Elsevier. 947pp.

51. Nathanson N, Ahmed R, Biron C, Brinton M, Gonzalez-Scarano F, Griffin D *et al.* 2007. *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2<sup>a</sup> Ed. London: Academic Press. 259pp.
52. Novoa C, Flores A. 1991. *Producción de rumiantes menores: alpacas*. Lima: Rerumen. 358pp.
53. Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z, *et al.* 2008. Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*) vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 70 (2): 197-201
54. Oha R. 1994. *Anatomía patológica de las diarreas infecciosas en crías de alpaca (*Lama pacos*) en la SAIS Aricoma Ltda.* 57. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 79pp.
55. Pabst O, Bernhardt G, Förster R. 2007. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J Leukoc Biol* 82: 795-800.
56. Palacios C, Perales R, Chavera A, López M, Braga W, Moro M. 2006. *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhea in Young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Vet Rec* 158: 344-345.
57. Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A. 1998. *Handbook of vertebrate immunology - camels and llamas*. California: Academic Press. 698pp.
58. Perdue M. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross-talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol* 277: G1-G5.
59. Pérez D. 2006. *Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia*. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 91pp.
60. Pérez D. 2010. *Caracterización toxigénica de la fosfolipasa C del *Clostridium perfringens* (Cp-PLC) y su relación con aislados casos de enterotoxemia en alpacas*. Tesis de Magister. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 151pp.
61. Petit L, Gibert M, Popoff M. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 7: 104-110.
62. Pinilla G, Cubillos K, Rodríguez M. 2008. *Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Colombia: NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas 6 (9): 65-75.
63. Porporatto C, Bianco I, Correa S. 2007. Modulation of the mucosal immune system with polysaccharides basis for an attractive therapeutic alternative. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 41 (2): 203-211.

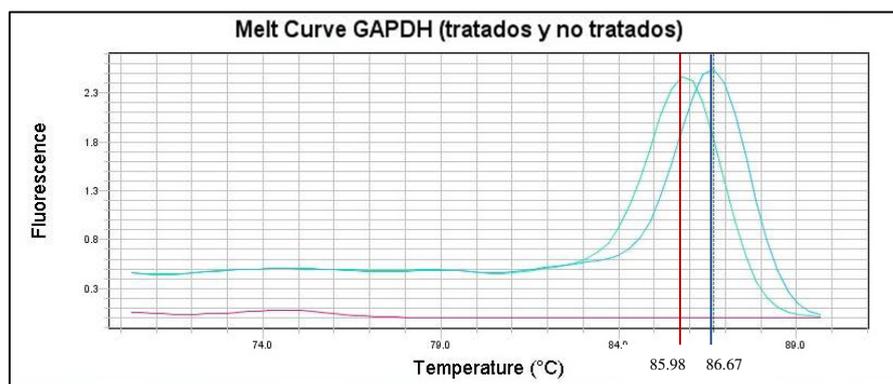
64. Quereda JJ. 2009. Expresión génica de las interleucinas 4, 5 y 13 en el cerdo tras la vacunación frente a circovirus porcino tipo 2 (PCV2). Tesis de Licenciado en Veterinario. España: Univ. De Murcia. 230pp.
65. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. Pub Tec FMV 34: 9-14.
66. Ramírez A. 1991. Enfermedades infecciosas. En: Fernández-Baca S, ed. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Chile: FAO. pp. 263-324.
67. Roca V. 2011. Caracterización histológica y dinámica linfoide de las placas de Peyer en crías de alpacas (*Vicugna pacos*) durante los primeros 45 días de vida. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 78pp.
68. Roitt IM, Delves PJ. 2003. Inmunología, fundamentos. 10ª ed. Madrid: Panamericana. 559pp.
69. Rosadio R, Ameghino E. 1994. Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. Vet Rec 135: 459-460.
70. Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. Vet Parasitol 168: 116-120.
71. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Llanco L, Castillo H, Véliz A, Yaya K, Londoño P. 2008. Enterotoxemia: new evidence on pathogenesis and prevention of the number one cause of neonatal alpaca mortality in South America. Sydney: Proc World Alpaca Conference. pp 50-55.
72. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. Perú: Rev Inv Vet 23 (3): 261-271.
73. Santiago E. 1995. Estudio del efecto de la interleucina 6 (IL-6) sobre la síntesis de colágeno, y de sus mecanismos de acción, en cultivo de lipocitos. Tesis doctoral. España: Univ. Complutense de Madrid. 189pp.
74. Sanz M. 2001. Inmunidad y prevención de la alergia a alimentos. Alergol Inmunol Clin 16 (2): 58-75.
75. Smedley JG, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. Rev Physiol Biochem Pharmacol 152: 183-204.
76. Strieter R, Belperio J, Keane M. 2002. Cytokines in innate host defense in the lung. J Clin Invest 109: 699-705.

77. Su C, Nguyen V, Nei M. 2002. Adaptive evolution of variable region genes encoding an unusual type of immunoglobulin in camelids. *Mol Biol Evol* 19 (3): 205-215.
78. Summerfiel A, McCullough K. 2009. The porcine dendritic cell family. *Dev Comp Immunol* 33: 299-309.
79. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. México: Investigación en discapacidad 2: 70-78.
80. Tizard IR. 2013. *Veterinary immunology*. 9<sup>a</sup> ed. Missouri: Elsevier. 551pp.
81. Vadillo SM, Píriz SD, Mateos EY. 2002. *Manual de microbiología veterinaria*. Madrid: McGraw-hill interamericana. 853pp.
82. Weaver DM, Tyler JW, Scott MA, Wallace LM, Marion RS, Holle JM. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 61: 738-741.
83. Weigmann B, Neurath M. 2002. T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. *Gut*. 51: 301-303.
84. Wernery U. 2001. Camelid immunoglobulins and their importance for the newborn - a review. *J Vet Med B* 48: 561-568.
85. Wheeler JC. 1995. Evolution and present situation of the South-American Camelidae. *Biol J Linnean Soc* 52: 271-295.
86. Wong M, Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.
87. Yaya KL, Rosadio RA. 2005. Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. Perú: *Rev Inv Vet* 16 (1): 49-55.
88. Yuan Q, Walker W. 2004. Innate immunity of the gut: Mucosal defense in health and disease. *JPGN* 38: 463-473.
89. Zaldivar M. 2002. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Méd Gen Integr* 5: 24-36.
90. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32: 103.

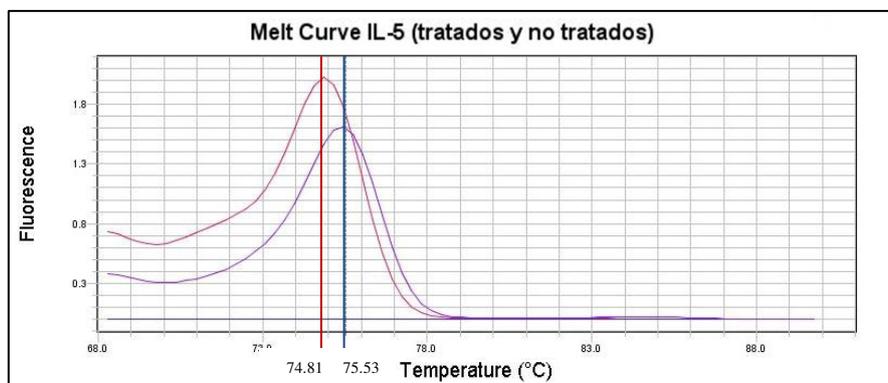
## VIII. APÉNDICE



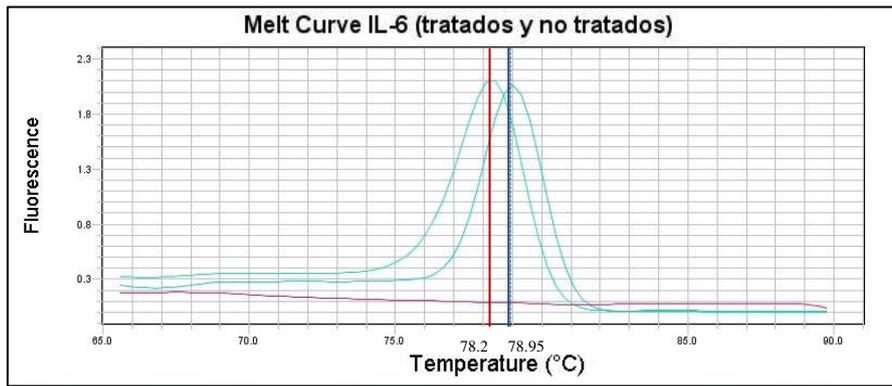
**Figura A-1.** Electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 1% del ARN total extraído para visualizar el ARN ribosomal 28S y 18S de células de la mucosa intestinal.



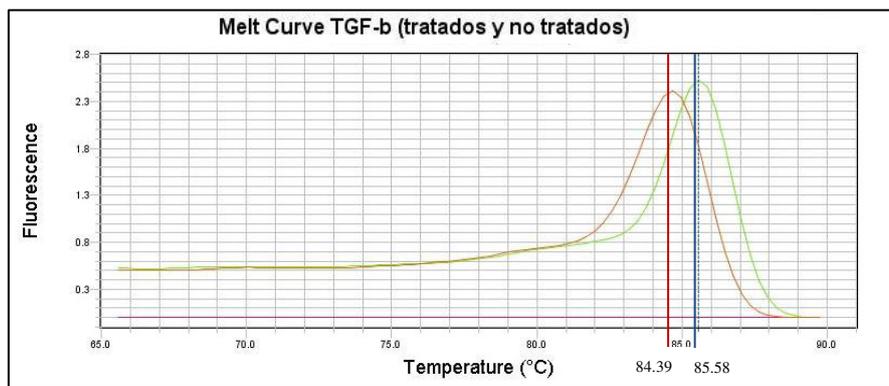
**Figura A-2.** Curvas de disociación ( $T_m$ ) de productos amplificados con cebadores específicos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas.



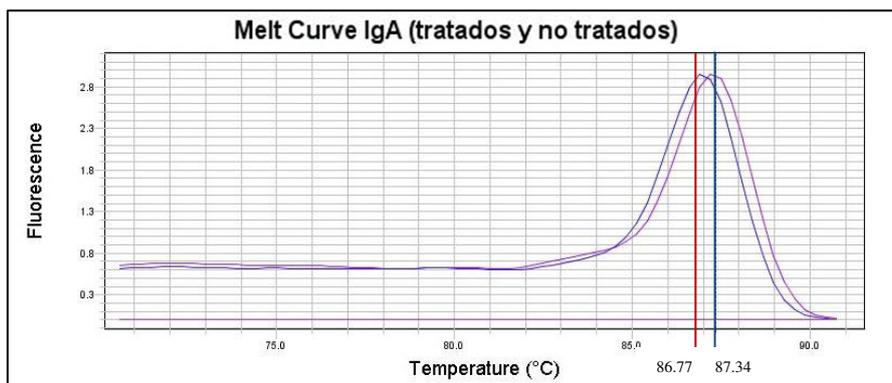
**Figura A-3.** Curvas de disociación ( $T_m$ ) de productos amplificados con cebadores específicos para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas.



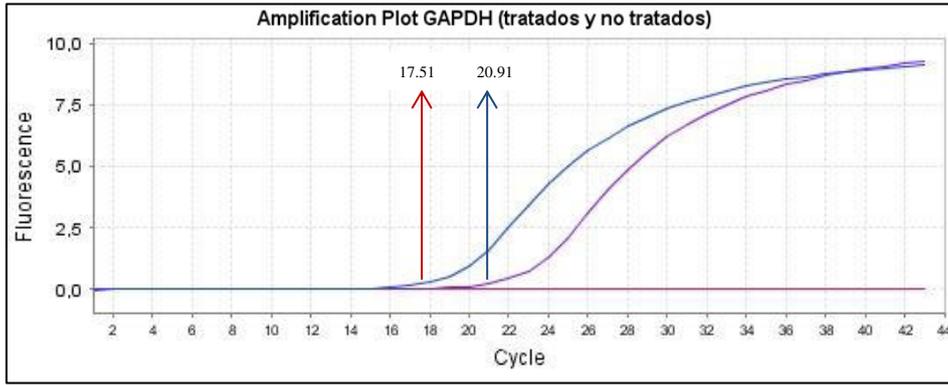
**Figura A-4.** Curvas de disociación ( $T_m$ ) de productos amplificados con cebadores específicos para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas.



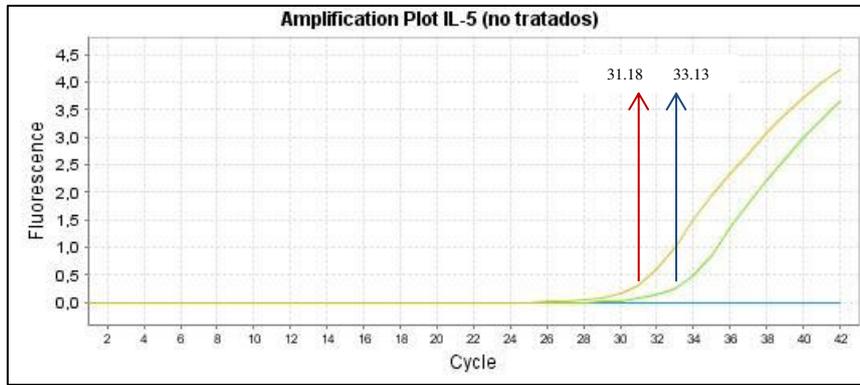
**Figura A-5.** Curvas de disociación ( $T_m$ ) de productos amplificados con cebadores específicos para TGF- $\beta$  en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas.



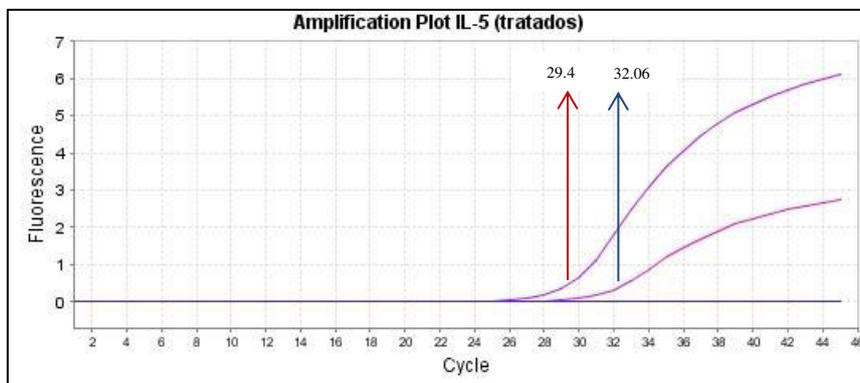
**Figura A-6.** Curvas de disociación ( $T_m$ ) de productos amplificados con cebadores específicos para el exón 3 de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas.



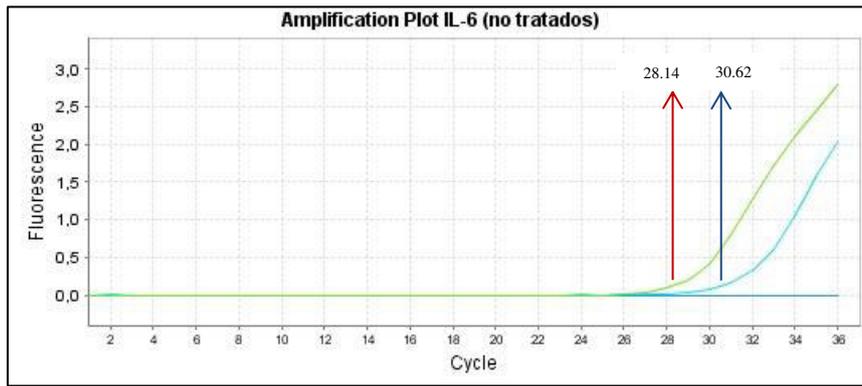
**Figura A-7.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas y no tratadas.



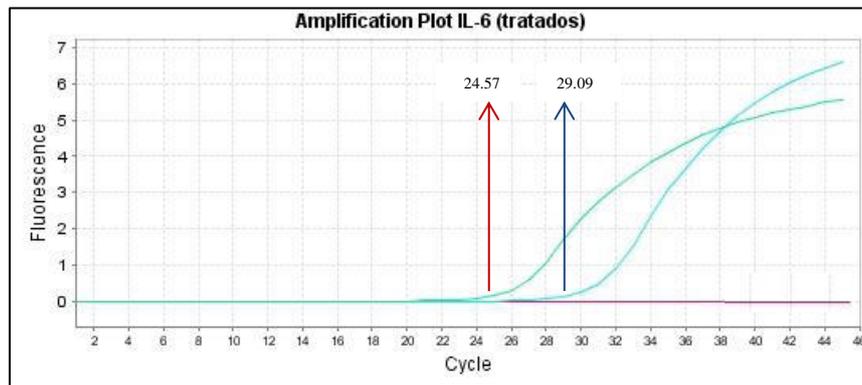
**Figura A-8.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas.



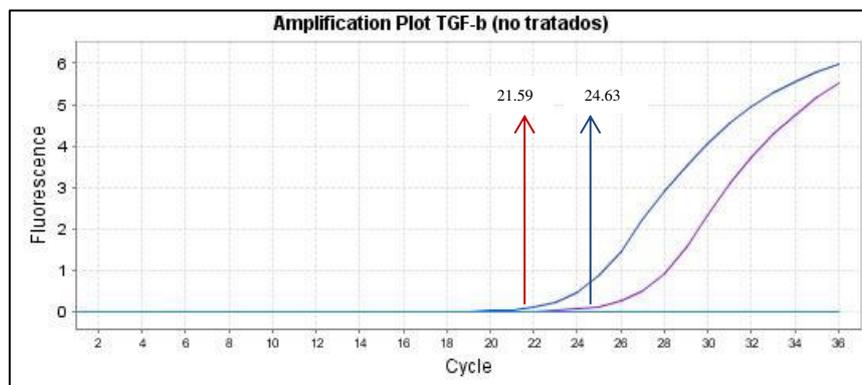
**Figura A-9.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas.



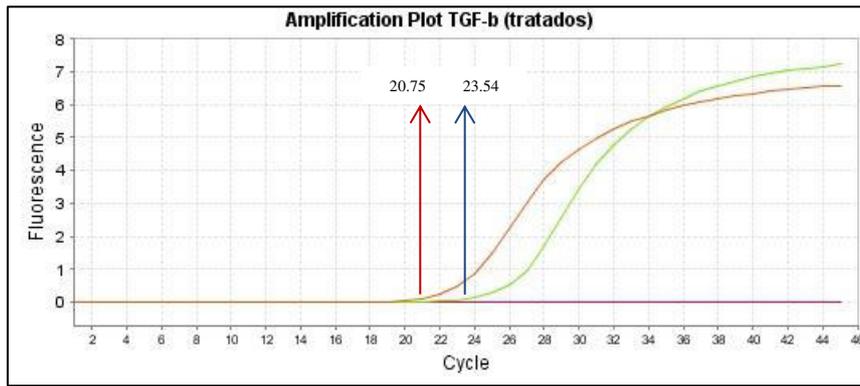
**Figura A-10.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas.



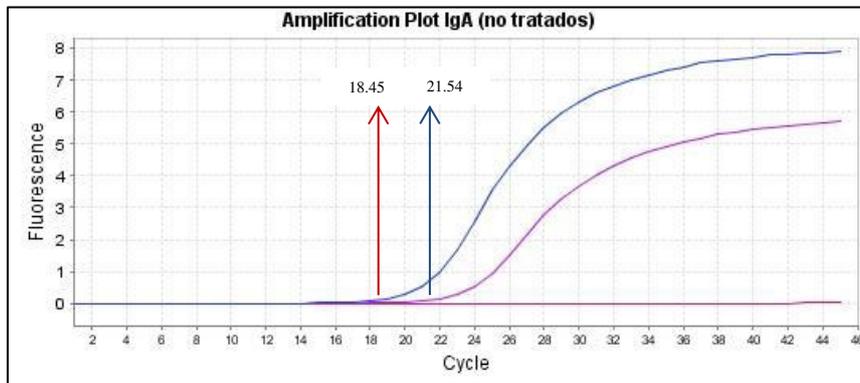
**Figura A-11.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas.



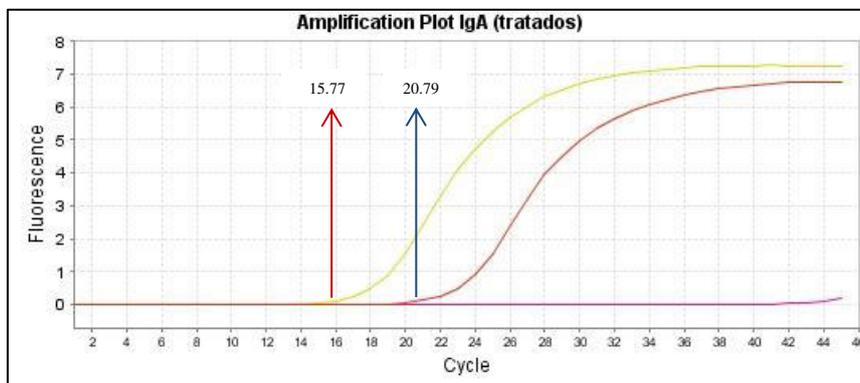
**Figura A-12.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para TGF- $\beta$  en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas.



**Figura A-13.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para TGF- $\beta$  en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas.



**Figura A-14.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para el exón 3 de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas.



**Figura A-15.** Curvas de amplificación (Ct) de productos amplificados con cebadores específicos para el exón 3 de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas tratadas.

**Cuadro I:** Temperatura de disociación de RT-PCR en tiempo real de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas utilizando los cebadores para GAPDH, IL-5, IL-6, TGF- $\beta$  y el exón 3 de IgA.

<b>GRUPOS</b>	<b>Muestra #</b>	<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Tm GAPDH (°C)</b>	<b>Tm IL-5 (°C)</b>	<b>Tm IL-6 (°C)</b>	<b>Tm TGF-<math>\beta</math> (°C)</b>	<b>Tm IgA (°C)</b>
<b>Calibrador</b>	1	8y46y-15	Feto	86.35	75.12	78.57	84.79	86.91
	2	20y-14	13d	86.39	75.26	78.2	84.46	87.05
<b>No tratados (3-4 semanas)</b>	3	38y-14	19d	86.24	75.26	78.8	84.92	87.1
	4	36y-14	20d	86.09	75.11	78.5	84.92	86.8
	5	17y-14	21d	86.54	75.11	78.2	84.61	86.98
	6	5y-14	26d	86.39	75.11	78.5	84.61	87.2
	7	21y-14	38d	86.39	75.26	78.8	84.61	87.34
<b>No tratados (6-8 semanas)</b>	8	16y-14	39d	86.54	74.81	78.2	84.54	87.05
	9	26y-14	41d	86.24	75.26	78.2	84.75	87.1
	10	23y-14	47d	86.24	75.04	78.5	84.39	86.9
	11	27y-14	47d	86.39	75.34	78.2	84.46	87.18
<b>Tratados (3-4 semanas)</b>	12	37y-15	15-18d	86.53	75.37	78.95	85.58	87
	13	29y-15	15-20d	86.53	74.93	78.35	84.68	86.77
	14	40y-15	20d	86.43	75.37	78.65	84.91	86.85
	15	38y-15	21d	86.48	75.44	78.95	85.28	87.59
	16	36y-15	21-25d	86.48	75.29	78.65	85.51	87.07
	17	39y-15	25d	86.23	75.37	78.72	85.28	87.22
	18	26y-15	25d	86.43	75.45	78.87	85.06	86.92
	19	27y-15	25d	86.23	75.53	78.65	84.98	86.92
<b>Tratados (6-8 semanas)</b>	20	30y-15	35d	86.53	75.23	78.87	84.98	87.07
	21	28y-15	35-40d	86.53	75.3	78.8	84.98	86.77
	22	32y-15	45d	86.53	75.23	78.95	85.13	87.07
	23	35y-15	45d	86.23	74.85	78.5	84.76	87.22
	24	31y-15	53d	85.98	75.3	78.87	85.28	87.07
	25	34y-15	53d	86.58	75.08	78.72	84.98	87.15
	26	33y-15	54d	86.67	75.3	78.72	85.13	87

**Cuadro II:** Resultados de la cuantificación relativa del ARNm de IL-5 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas con respecto al calibrador.

<b>GRUPOS</b>	<b>Muestra</b>	<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Ct IL-5</b>	<b>Ct GAPDH</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>
<b>Calibrador</b>	1	8y46y-15	Feto	36.4	23.36	1
	2	20y-14	13d	31.18	18.95	1.75
	3	38y-14	19d	32.97	20.12	1.14
<b>No tratados (3-4 semanas)</b>	4	36y-14	20d	32.47	19.79	1.28
	5	17y-14	21d	31.82	17.68	0.47
	6	5y-14	26d	31.86	17.54	0.41
	7	21y-14	38d	32.16	20.68	2.95
	8	16y-14	39d	32.49	18.99	0.73
<b>No tratados (6-8 semanas)</b>	9	26y-14	41d	33.13	20.33	1.19
	10	23y-14	47d	31.78	19.07	1.26
	11	27y-14	47d	31.96	20.91	3.97
<b>Tratados (3-4 semanas)</b>	12	37y-15	15-18d	31.59	18.95	1.32
	13	29y-15	15-20d	30.31	18.89	3.07
	14	40y-15	20d	31.7	18.55	0.93
	15	38y-15	21d	32.06	19.92	1.87
	16	36y-15	21-25d	31.2	19.07	1.88
	17	39y-15	25d	31.38	19.62	2.43
	18	26y-15	25d	30.81	18.88	2.16
	19	27y-15	25d	30.71	18.7	2.04
<b>Tratados (6-8 semanas)</b>	20	30y-15	35d	30.77	17.89	1.12
	21	28y-15	35-40d	29.4	19.31	7.73
	22	32y-15	45d	31.72	19	1.25
	23	35y-15	45d	30.36	19.24	3.78
	24	31y-15	53d	31.47	18.75	1.25
	25	34y-15	53d	30.15	17.51	1.32
	26	33y-15	54d	31.53	19	1.42

**Cuadro III:** Resultados de la cuantificación relativa de ARNm de IL-6 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas con respecto al calibrador.

<b>GRUPOS</b>	<b>Muestra</b>	<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Ct IL-6</b>	<b>Ct GAPDH</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>
<b>Calibrador</b>	1	8y46y-15	Feto	32.9	23.36	1
	2	20y-14	13d	28.83	18.95	0.79
<b>No tratados (3-4 semanas)</b>	3	38y-14	19d	30.24	20.12	0.67
	4	36y-14	20d	28.17	19.79	2.23
	5	17y-14	21d	28.25	17.68	0.49
	6	5y-14	26d	30.62	17.54	0.09
	7	21y-14	38d	28.28	20.68	3.84
<b>No tratados (6-8 semanas)</b>	8	16y-14	39d	28.75	18.99	0.86
	9	26y-14	41d	28.85	20.33	2.03
	10	23y-14	47d	29.31	19.07	0.62
	11	27y-14	47d	28.14	20.91	4.96
<b>Tratados (3-4 semanas)</b>	12	37y-15	15-18d	29.09	18.95	0.66
	13	29y-15	15-20d	24.57	18.89	14.52
	14	40y-15	20d	25.94	18.55	4.44
	15	38y-15	21d	27.07	19.92	5.24
	16	36y-15	21-25d	27.15	19.07	2.75
	17	39y-15	25d	26.87	19.62	4.89
	18	26y-15	25d	26.79	18.88	3.1
	19	27y-15	25d	26.82	18.7	2.68
<b>Tratados (6-8 semanas)</b>	20	30y-15	35d	28.48	17.89	0.48
	21	28y-15	35-40d	24.79	19.31	16.68
	22	32y-15	45d	27.34	19	2.3
	23	35y-15	45d	28.18	19.24	1.52
	24	31y-15	53d	27.31	18.75	1.97
	25	34y-15	53d	26.62	17.51	1.35
	26	33y-15	54d	26.94	19	3.03

**Cuadro IV:** Resultados de la cuantificación relativa de ARNm de TGF- $\beta$  de muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas con respecto al calibrador.

<b>GRUPOS</b>	<b>Muestra</b>	<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Ct TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Ct GAPDH</b>	<b>2<sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup></b>
<b>Calibrador</b>	1	8y46y-15	Feto	27.9	23.36	1
<b>No tratados (3-4 semanas)</b>	2	20y-14	13d	24.63	18.95	0.45
	3	38y-14	19d	24.58	20.12	1.06
	4	36y-14	20d	23.36	19.79	1.96
	5	17y-14	21d	22.35	17.68	0.92
	6	5y-14	26d	21.59	17.54	1.40
	<b>No tratados (6-8 semanas)</b>	7	21y-14	38d	23.71	20.68
8		16y-14	39d	23.31	18.99	1.16
9		26y-14	41d	24.34	20.33	1.44
10		23y-14	47d	23.47	19.07	1.10
11		27y-14	47d	23.71	20.91	3.34
<b>Tratados (3-4 semanas)</b>	12	37y-15	15-18d	22.53	18.95	1.95
	13	29y-15	15-20d	20.75	18.89	6.41
	14	40y-15	20d	22.91	18.55	1.13
	15	38y-15	21d	23.15	19.92	2.48
	16	36y-15	21-25d	23.54	19.07	1.05
	17	39y-15	25d	21.8	19.62	5.13
	18	26y-15	25d	22.36	18.88	2.09
	19	27y-15	25d	21.86	18.7	2.60
<b>Tratados (6-8 semanas)</b>	20	30y-15	35d	22.34	17.89	1.06
	21	28y-15	35-40d	21.6	19.31	4.76
	22	32y-15	45d	22.31	19	2.35
	23	35y-15	45d	21.95	19.24	3.56
	24	31y-15	53d	21.87	18.75	2.68
	25	34y-15	53d	21.7	17.51	1.27
	26	33y-15	54d	22.93	19	1.53

**Cuadro V:** Resultados de la cuantificación relativa del ARNm de IgA de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas no tratadas y tratadas con respecto al calibrador.

<b>GRUPOS</b>	<b>Muestra</b>	<b>ID</b>	<b>Edad</b>	<b>Ct IgA</b>	<b>Ct GAPDH</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>
<b>Calibrador</b>	1	8y46y-15	Feto	31.62	23.36	1
	2	20y-14	13d	19.11	18.95	274.37
	3	38y-14	19d	19.92	20.12	352.14
<b>No tratados (3-4 semanas)</b>	4	36y-14	20d	21.54	19.79	91.14
	5	17y-14	21d	18.45	17.68	179.77
	6	5y-14	26d	19.76	17.54	65.8
	7	21y-14	38d	20.9	20.68	263.2
	8	16y-14	39d	19.79	18.99	176.07
<b>No tratados (6-8 semanas)</b>	9	26y-14	41d	19.66	20.33	487.75
	10	23y-14	47d	19.34	19.07	254.23
	11	27y-14	47d	19.92	20.91	608.87
<b>Tratados (3-4 semanas)</b>	12	37y-15	15-18d	18.2	18.95	515.56
	13	29y-15	15-20d	17.27	18.89	942.27
	14	40y-15	20d	16.2	18.55	1562.89
	15	38y-15	21d	19.47	19.92	418.77
	16	36y-15	21-25d	16.71	19.07	1573.76
	17	39y-15	25d	18.49	19.62	670.92
	18	26y-15	25d	20.79	18.88	81.57
	19	27y-15	25d	18.46	18.7	362.04
<b>Tratados (6-8 semanas)</b>	20	30y-15	35d	18.44	17.89	209.38
	21	28y-15	35-40d	18.43	19.31	564.18
	22	32y-15	45d	18.29	19	501.46
	23	35y-15	45d	18.98	19.24	367.09
	24	31y-15	53d	17.97	18.75	526.39
	25	34y-15	53d	15.77	17.51	1024
	26	33y-15	54d	16.88	19	1332.57

## Anexo I: Análisis estadístico para la expresión de IL-5

**Prueba de Shapiro wilk:** Análisis de normalidad de la variable.

```
. swilk IL_5
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IL_5	25	0.74151	7.183	4.031	0.00003

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre grupos no tratados y tratados.

```
. ranksum IL_5, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	10	100	130
Si vacunado	15	225	195
combined	25	325	325

unadjusted variance      325.00  
adjustment for ties      -0.25  
-----  
adjusted variance      324.75

Ho: IL\_5(Tratam~o==No vacunado) = IL\_5(Tratam~o==Si vacunado)  
z = -1.665  
Prob > |z| = 0.0960

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 15 a 28 días de edad (3-4 semanas).

```
-> Grupo = 3-4 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	19	35
Si vacunado	8	72	56
combined	13	91	91

unadjusted variance            46.67  
 adjustment for ties            -0.00  
 -----  
 adjusted variance                46.67

Ho: IL\_5(Tratam~o==No vacunado) = IL\_5(Tratam~o==Si vacunado)  
 z = -2.342  
 Prob > |z| = 0.0192

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 35 a 56 días de edad (6-8 semanas).

```
-> Grupo = 6-8 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	30	32.5
Si vacunado	7	48	45.5
combined	12	78	78

unadjusted variance            37.92  
 adjustment for ties            -0.13  
 -----  
 adjusted variance                37.78

Ho: IL\_5(Tratam~o==No vacunado) = IL\_5(Tratam~o==Si vacunado)  
 z = -0.407  
 Prob > |z| = 0.6842

## Anexo II: Análisis estadístico para la expresión de IL-6

**Prueba de Shapiro wilk:** Análisis de normalidad de la variable.

```
. swilk IL_6
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IL_6	25	0.66453	9.322	4.563	0.00000

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre grupos no tratados y tratados.

```
. ranksum IL_6, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	10	95	130
Si vacunado	15	230	195
combined	25	325	325

unadjusted variance      325.00  
adjustment for ties      0.00  
-----  
adjusted variance      325.00

Ho: IL\_6(Tratamiento==No vacunado) = IL\_6(Tratamiento==Si vacunado)  
z = -1.941  
Prob > |z| = 0.0522

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 15 a 28 días de edad (3-4 semanas).

```
-> Grupo = 3-4 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	18	35
Si vacunado	8	73	56
combined	13	91	91

unadjusted variance            46.67  
 adjustment for ties            -0.00  
 -----  
 adjusted variance               46.67

Ho: IL\_6(Tratam~o==No vacunado) = IL\_6(Tratam~o==Si vacunado)  
 z = -2.489  
 Prob > |z| = 0.0128

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 35 a 56 días de edad (6-8 semanas).

```
-> Grupo = 6-8 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	33	32.5
Si vacunado	7	45	45.5
combined	12	78	78

unadjusted variance            37.92  
 adjustment for ties            0.00  
 -----  
 adjusted variance               37.92

Ho: IL\_6(Tratam~o==No vacunado) = IL\_6(Tratam~o==Si vacunado)  
 z = 0.081  
 Prob > |z| = 0.9353

### Anexo III: Análisis estadístico para la expresión de TGF- $\beta$

**Prueba de Shapiro wilk:** Análisis de normalidad de la variable.

```
. swilk TGF_b
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
TGF_b	25	0.85801	3.946	2.806	0.00251

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre grupos no tratados y tratados.

```
. ranksum TGF_b, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	10	97.5	130
Si vacunado	15	227.5	195
combined	25	325	325

unadjusted variance      325.00  
adjustment for ties      -0.13  
-----  
adjusted variance      324.88

Ho: TGF\_b(Tratamiento==No vacunado) = TGF\_b(Tratamiento==Si vacunado)  
z = -1.803  
Prob > |z| = 0.0714

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 15 a 28 días de edad (3-4 semanas).

```
-> Grupo = 3-4 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	21	35
Si vacunado	8	70	56
combined	13	91	91

unadjusted variance            46.67  
 adjustment for ties            -0.00  
 -----  
 adjusted variance               46.67

Ho: TGF\_b(Tratam~o==No vacunado) = TGF\_b(Tratam~o==Si vacunado)  
 z = -2.049  
 Prob > |z| = 0.0404

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 35 a 56 días de edad (6-8 semanas).

```
-> Grupo = 6-8 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	29	32.5
Si vacunado	7	49	45.5
combined	12	78	78

unadjusted variance            37.92  
 adjustment for ties            0.00  
 -----  
 adjusted variance               37.92

Ho: TGF\_b(Tratam~o==No vacunado) = TGF\_b(Tratam~o==Si vacunado)  
 z = -0.568  
 Prob > |z| = 0.5698

#### Anexo IV: Análisis estadístico para la expresión de IgA

**Prueba de Shapiro wilk:** Análisis de normalidad de la variable.

```
. swilk Ig_A
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Ig_A	25	0.84334	4.353	3.007	0.00132

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre grupos no tratados y tratados.

```
. ranksum Ig_A, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	10	80	130
Si vacunado	15	245	195
combined	25	325	325

unadjusted variance      325.00  
adjustment for ties      0.00  
-----  
adjusted variance      325.00

Ho: Ig\_A(Tratam~o==No vacunado) = Ig\_A(Tratam~o==Si vacunado)  
z = -2.774  
Prob > |z| = 0.0055

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 15 a 28 días de edad (3-4 semanas).

```
-> Grupo = 3-4 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	19	35
Si vacunado	8	72	56
combined	13	91	91

unadjusted variance            46.67  
 adjustment for ties            -0.00  
 -----  
 adjusted variance               46.67

Ho:  $Ig_A(\text{Tratam} \sim o == \text{No vacunado}) = Ig_A(\text{Tratam} \sim o == \text{Si vacunado})$   
 $z = -2.342$   
 Prob > |z| = 0.0192

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre animales no tratados y tratados, para el subgrupo de 35 a 56 días de edad (6-8 semanas).

```
-> Grupo = 6-8 semanas
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
No vacunado	5	24	32.5
Si vacunado	7	54	45.5
combined	12	78	78

unadjusted variance            37.92  
 adjustment for ties            0.00  
 -----  
 adjusted variance               37.92

Ho:  $Ig_A(\text{Tratam} \sim o == \text{No vacunado}) = Ig_A(\text{Tratam} \sim o == \text{Si vacunado})$   
 $z = -1.380$   
 Prob > |z| = 0.1675