



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Expresión de los genes de los receptores TCR $\gamma\delta$ en la
mucosa intestinal de yeyuno de crías de alpaca
(*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Simón Oswaldo MENDIZÁBAL JÁUREGUI

ASESOR

Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

Referencia bibliográfica

Mendizábal S. Expresión de los genes de los receptores TCR $\gamma\delta$ en la mucosa intestinal de yeyuno de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2016.



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 20 de diciembre de 2016, a las 14:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 143-EPMV/FMV-2016, integrado por los siguientes profesores:

RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA	Presidente del Jurado
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Asesor de la Tesis
ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY	Miembro del Jurado
WILFREDO HUANCA LÓPEZ	Miembro del Jurado

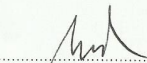
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: MENDIZÁBAL JÁUREGUI, SIMÓN OSWALDO, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

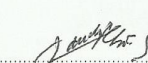
“EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES TCR $\gamma\delta$ EN LA MUCOSA INTESTINAL DE YEYUNO DE CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”

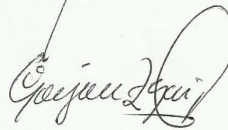
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su APROBACIÓN por UNANIMIDAD, otorgándole la nota de QUINCE (15).

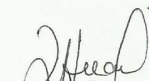
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado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

Siendo las 15:15 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:


Raúl Rosadio Alcántara: PhD. Prof. Principal, T.C.


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


Armando González Zariquiey: PhD. Prof. Principal, T.C.


Wilfredo Huanca López: MV. Prof. Asociado D.E.





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° 0143-EPMV/FMV-2016

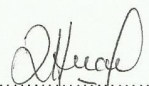
PRESIDENTE :


RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA

MIEMBROS :


ALBERTO MANCHEGO SAYÁN
Asesor de la Tesis


ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY


WILFREDO HUANCA LÓPEZ

San Borja, 20 de diciembre de 2016

Vº Bº


Dra. Daphne Ramos Delgado
Directora (e) de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria



DEDICATORIA

A mis padres, Pilar y José, por nunca perder la fe en mí y
darme soporte hasta en los momentos más difíciles.

Este trabajo es por y para ustedes.

A mis hermanos, Mache, Marita y Cuto, por
siempre estar pendiente de mis avances y
brindarme su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Alberto Manchego, por recibirme con los brazos abiertos y estar pendiente del progreso de este trabajo.

A Gina Castro, por la gran ayuda que me brindó en este arduo camino.

A mis colegas del SENASA, por demostrarme que la vida siempre tiene un lado bello.

A Lizbeth y Patricia, por estar ahí para levantarme del suelo.

A Yuriko, por ayudarme a recuperar mis objetivos.

A Susana, Jazmín y Jorge, por hacerme vivir un milagro e impulsarme a mi gran cambio.

A Bruno, Junior, Jason y Pablo, por estar a mi lado en estos meses que más los necesitaba. Han creado un monstruo, muchachos.

A Rafita, por llenar nuestro hogar con sonrisas.

JLPP, SEEMC

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE APÉNDICE	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 La producción alpaquera	2
2.2 La placenta de los camélidos	5
2.3 Principales enfermedades infecciosas de las crías de alpaca	5
2.3.1 Enteritis infecciosa neonatal (diarrea neonatal o colibacilosis)	6
2.3.2 Enterotoxemia	7
2.3.3 Eimeriosis	10
2.4 Generalidades sobre inmunidad	10
2.4.1 Sistema inmune innato	12
2.4.2 Sistema inmune adquirido	12
2.5 Inmunidad en mucosas	13
2.6 Inmunidad celular	14
2.7 Reconocimiento de antígenos	15
2.8 Procesamiento de antígenos	16
2.8.1 MHC	16
2.9 Presentación del antígeno	17
2.10 El linfocito T	17
2.11 Receptor de linfocito T (TCR)	18
2.11.1 Generación de diversidad para el reconocimiento del antígeno	20
2.12 Genética del TCR	20
2.12.1 Genética de las inmunoglobulinas	21

2.12.1.1	Adición o eliminación de nucleótidos en las uniones de segmentos génicos	22
2.12.1.2	Diversidad combinatoria	24
2.12.1.3	Diversidad en la región D	25
2.12.1.4	Ensamblaje de cadenas ligeras	25
2.12.1.5	Ensamblaje de cadenas pesadas	26
2.12.2	Diversidad de los receptores de linfocitos T	26
2.12.2.1	Cadenas alfa y delta (α/δ)	27
2.12.2.2	Cadena beta (β)	27
2.12.2.3	Cadena gamma (γ)	27
2.13	Reconocimiento del antígeno usando el MHC	28
2.14	Reconocimiento del antígeno sin el uso del MHC	28
2.15	Activación del linfocito	28
2.16	Linfocitos T gamma-delta ($T\gamma\delta$)	29
2.16.1	Linfocitos T $V\gamma9V\delta2$	30
2.17	Linfocitos intraepiteliales	31
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1	Animales	33
3.2	Obtención y almacenamiento de muestras	34
3.3	Expresión de $TCR\gamma\delta$	34
3.3.1	Extracción de ARN total	34
3.3.2	Síntesis de ADNc (Transcripción reversa)	35
3.3.3	PCR Tiempo real	36
3.3.4	Análisis del RT-PCR tiempo real	37
3.3.5	Análisis de la temperatura de disociación	37
3.3.6	Cuantificación relativa de cadenas de $TCR\gamma$ y δ	38
3.4	Análisis estadístico	40
IV.	RESULTADOS	41
4.1	GAPDH	41
4.1.1	Expresión de GAPDH	41
4.2	Gen Gamma (γ)	41

4.2.1	Expresión del gen gamma	41
4.2.2	Cuantificación relativa del gen gamma	42
4.2.3	Análisis estadístico complementario del gen gamma	43
4.3	Gen Delta (δ)	45
4.3.1	Expresión del gen delta	45
4.3.2	Cuantificación relativa del gen delta	45
4.3.3	Análisis estadístico complementario del gen delta	47
V.	DISCUSIÓN	49
VI.	CONCLUSIÓN	52
VII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	53
VIII.	APÉNDICE	56

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de genes del receptor TCR $\gamma\delta$ (gamma y delta) en el epitelio yeyunal de crías de alpaca aparentemente sanas, de 2 a 47 días de edad, mediante la cuantificación de ARN mensajero (ARNm) de los genes antes mencionados utilizando cebadores específicos. Se tomó porciones de yeyuno, de 2 cm de longitud, de crías de alpacas aparentemente sanas (n=16). Se obtuvo el ARNm total de la mucosa de la porción media del yeyuno, el cual actuó como molde para la síntesis de ADNc mediante transcripción reversa (RT), seguida de un PCR en Tiempo Real para la amplificación y cuantificación de los ARNm de los polipéptidos que conforman las cadenas gamma y delta del TCR. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para la cuantificación relativa de ARNm teniendo como calibrador a dos crías recién nacidas sin consumo de calostro. Las crías de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y de 4 a más semanas de edad expresaron el gen gamma en 4.75, 6.78, 16.24 y 103.11 veces lo expresado por los animales calibradores, respectivamente, y el gen delta fue expresado en 9.43, 20.78, 25.08 y 146.46 veces lo expresado por los animales calibradores, respectivamente. A partir de la cuarta semana de edad, se detectó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), tanto en la cadena gamma como en la delta, mediante el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras. Los resultados demuestran que los genes gamma y delta se expresan en forma ascendente con la edad y que a partir de la cuarta semana de vida de las alpacas, la expresión de las cadenas gamma y delta aumenta considerablemente, indicando que los linfocitos T $\gamma\delta$ se incrementan en la mucosa intestinal al aumentar la edad.

Palabras claves: alpacas, TCR, gamma, delta, PCR, RT-PCR tiempo real, cuantificación relativa

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the expression of genes from the TCR $\gamma\delta$ receptor (gamma and delta) on jejunal epithelium of baby alpacas with no signs of illness, from about 2 to 47 days old, through quantification of messenger RNA (mRNA) of genes previously mentioned, using specific primers. This study was done by taking portions of jejunum, 2cm long, of baby alpacas with no signs of illness (n=16). Total mRNA was obtained from the mid portion of jejunum, which served as template for cDNA synthesis by reverse transcription (RT), followed by Real-Time PCR to amplify and quantify mRNA of polypeptides that shape gamma and delta chains of TCR. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to the relative quantification of mRNA, having 2 newborn alpacas that didn't consume colostrum as calibrators. Baby alpacas 1 week old, 2 weeks old, 3 weeks old and more than 3 weeks old expressed gamma gene 4.75, 6.78, 16.24 and 103.11 times the amount expressed by calibrators, respectively, and delta gene was expressed 9.43, 20.78, 25.08 and 146.46 times the amount expressed by calibrators, respectively. From the fourth week of age, statistical difference was detected ($p<0.05$), in gamma chain as in delta chain, by using two-sample Kolmogorov-Smirnov test. Results show that the expression of gamma and delta genes ascends with the age, and from the fourth week of age of alpacas, the expression of gamma and delta chains increases considerably, showing that population of T $\gamma\delta$ lymphocytes at the intestinal mucosa increases with the age.

Keywords: alpacas, TCR, gamma, delta, PCR, RT-PCR real time, relative quantification

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Adición de nucleótidos en la unión de segmentos génicos, sin la presencia de una secuencia molde.	22
Figura 2.	Adición de nucleótidos en la unión de segmentos génicos, usando la cadena de ADN más larga como molde.	23
Figura 3.	Diversidad de uniones entre dos segmentos de línea que produce tres variantes de secuencia.	24
Figura 4.	Promedios de los valores de cuantificación relativa de los genes de Gamma del TCR de crías de alpacas según los grupos etarios.	43
Figura 5.	Diferencias estadísticas de los valores del gen gamma entre grupos etarios.	44
Figura 6.	Promedios de los valores de cuantificación relativa de los genes de Delta del TCR de crías de alpacas según los grupos etarios.	47
Figura 7.	Diferencias estadísticas de los valores del gen delta entre grupos etarios.	48

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Cuantificación relativa del gen gamma del TCR de crías de alpacas.	42
Cuadro 2.	Resultados del análisis de la expresión relativa del gen gamma del TCR con la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras.	44
Cuadro 3.	Cuantificación relativa del gen delta del TCR de crías de alpacas.	46
Cuadro 4.	Resultados del análisis de la expresión relativa del gen delta del TCR con la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras.	48

LISTA DE APÉNDICE

	Pag.
Cuadro A.1. Ct del gen GAPDH de alpacas estudiadas.	56
Cuadro A.2. Ct y temperatura de disociación de los valores gamma.	58
Cuadro A.3. Ct y temperatura de disociación (Tm) de los valores delta	64
Figura A.1. Curva de amplificación de los valores del gen gamma del TCR de las 16 crías de alpacas.	57
Figura A.2. Derivada de la curva de disociación de los productos del PCR tiempo real del gen gamma del TCR de 16 crías de alpacas.	57
Figura A.3. Prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los valores de expresión del gen gamma presentan una distribución normal.	58
Figura A.4. Prueba de Kruskal-Wallis para detectar si existe diferencia significativa en los valores del gen gamma entre grupos etarios.	59
Figura A.5.1. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 2.	59
Figura A.5.2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 3.	60
Figura A.5.3. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 4.	60
Figura A.5.4. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 2 y 3.	61
Figura A.5.5. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 2 y 4.	61

Figura A.5.6.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 3 y 4.	62
Figura A.6.	Curva de amplificación de los valores del gen delta del TCR de las 16 crías de alpacas.	62
Figura A.7.	Derivada de la curva de disociación de los productos del PCR tiempo real del gen delta del TCR de 16 crías de alpacas.	63
Figura A.8.	Prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los valores de expresión del gen delta presentan una distribución normal.	64
Figura A.9.	Prueba de Kruskal-Wallis para detectar si existe diferencia significativa en los valores del gen delta entre grupos erarios.	65
Figura A.10.1.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 1 y 2.	65
Figura A.10.2.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 1 y 3.	66
Figura A.10.3.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 1 y 4.	66
Figura A.10.4.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 2 y 3.	67
Figura A.10.5.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 2 y 4.	67
Figura A.10.6.	Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 3 y 4.	68

I. INTRODUCCIÓN

La alta mortalidad de crías de alpacas y llamas en las comunidades y criaderos privados en la Puna de la sierra peruana a causa de enfermedades infecciosas (FAO, 2005; Mamani *et al.*, 2009) crea la necesidad de tener amplios conocimientos de las fisiopatologías de estas enfermedades. Se ha hecho avances en los conocimientos de la identificación de los agentes infecciosos y se ha determinado la participación de las bacterias *Clostridium perfringens* y *E. coli*, los virus rotavirus y coronavirus y los parásitos *Eimeria spp.* y *Cryptosporidium spp.* en los complejos entéricos de las crías; sin embargo, existe escaso conocimiento de la respuesta inmune de la mucosa intestinal de las alpacas, sobre todo de las crías, que permita comprender la participación del sistema inmune en el desarrollo de la fisiopatología de las enfermedades y los métodos para tratarlas y prevenirlas, siendo el tracto intestinal una de las principales puertas de entrada para los microorganismos patógenos y, a su vez, una de las superficies corporales donde tales microorganismos se detectan y son combatidos. En la mucosa intestinal de otros animales domésticos como la vaca, se desarrolla respuestas inmunes innatas de tipo celular que incluyen linfocitos especializados denominados $T\gamma\delta$ (por su estructura de TCR) que están en mayor concentración en esta área y cumplen un vital rol en la protección de las mucosas al actuar como células efectoras y también estimuladoras del sistema inmune adaptativo. En los rumiantes, los linfocitos $T\gamma\delta$ también se encuentran en altas concentraciones a nivel sanguíneo y esa concentración es mayor cuando son jóvenes. Dichos linfocitos son necesarios para una inmunorreacción celular temprana en animales cuyas inmunoglobulinas no atraviesan la placenta (Tizard, 2002). Por lo expuesto en este trabajo, se investiga sobre la expresión de los genes de los polipéptidos gamma y delta que conforman el TCR de los linfocitos en la mucosa intestinal de las crías de alpacas, hipotetizando que la expresión de los genes del $TCR\gamma\delta$ en la mucosa intestinal de yeyuno de crías de alpaca va incrementando en las primeras semanas de vida. En este estudio, el objetivo principal es determinar la expresión de los genes codificadores del $TCR\gamma\delta$ en la mucosa intestinal de yeyuno de crías de alpacas y los objetivos específicos son determinar molecularmente la presencia de ARNm de dichos genes en la mucosa yeyunal de las crías de alpacas y determinar el nivel de la expresión de tales genes en las crías de alpacas en las primeras semanas de edad. Los resultados reforzarán los hallazgos de otras investigaciones sobre la inmunidad en mucosas de alpacas en donde se está determinando que la respuesta inmune del tracto intestinal en las primeras semana de vida tiene un perfil Th1 (de tipo celular), en donde las citoquinas producidas por los linfocitos $T\gamma\delta$ refuerzan este perfil.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La producción alpaquera

La crianza de camélidos sudamericanos, principalmente la alpaca, es patrimonio de países como Perú, Bolivia y en menor cuantía de Chile y Argentina (FAO, 2005; Ramírez, 2011). Es una actividad única e ideal para las condiciones de producción en las zonas altoandinas del Perú (Rosadio *et al.*, 2012a).

El Perú es el principal productor de camélidos domésticos sudamericanos (alpacas y llamas) del mundo, con más de 4.2 millones de cabezas (de las cuales aproximadamente 3 millones son alpacas), lo que representa más del 84% de los camélidos sudamericanos existentes en el mundo (Moya y Torres, 2008; Rosadio *et al.*, 2012b). La región de Puno cuenta con más del 50% de la población total de alpacas del país (FAO, 2005; Ramírez, 2011). La crianza de alpacas y llamas en el Perú se desarrolla a altitudes que van desde los 3800 hasta más de 5000 metros sobre el nivel del mar. Entre los 3800 y 4000 metros de altitud, la crianza de alpacas y llamas por lo general se combina con la de otras especies animales y algunos cultivos, pero por encima de los 4000 metros, la actividad predominante es la crianza de camélidos, en particular alpacas (FAO, 2005).

La introducción en el nuevo mundo de especies foráneas de animales domésticos provenientes del viejo mundo, como los ovinos y bovinos, hizo que las especies nativas no solo fueran descuidadas, sino desplazadas a las zonas más inhóspitas de los Andes donde sobrevivieron gracias a su enorme poder de adaptación a lugares donde los pastos naturales no solo son limitados sino aun de baja calidad nutritiva (FAO, 2005; Mamani *et al.*, 2009).

Los camélidos sudamericanos (CSA) son una riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas. Bajo el término CSA se incluye dos especies domésticas, la alpaca (*Lama pacos*) y la llama (*Lama glama*), y dos silvestres, la vicuña (*Lama vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) (FAO, 2005).

La agroindustria de los camélidos sudamericanos es una actividad única e ideal para las condiciones de producción en las zonas altoandinas del Perú (Rosadio *et al.*, 2012a; Dionisio *et al.*, 2014). La crianza de estas especies domésticas proporciona carne de alto valor proteico con bajo colesterol, así como su fibra (principalmente la de alpaca) de gran demanda nacional y mundial por su fina textura (FAO, 2005; Mamani *et al.*, 2009). La crianza de alpacas en

ambientes comunales es prácticamente de subsistencia, caracterizadas por un pobre rendimiento productivo y el verdadero potencial productivo y económico de estas especies no se expresa a cabalidad debido a múltiples factores como las reducidas tasas de fertilidad y los altos niveles de mortalidad neonatal ocasionados principalmente por enfermedades infecciosas. Desgraciadamente, los datos no pueden ser analizados por carencia de registros productivos y sanitarios (Rosadio *et al.*, 2012a; Rosadio *et al.*, 2012c).

La alpaca (*Lama pacos*) es la especie de CSA de mayor existencia numérica en el Perú y la más cotizada por la producción de fibra. Alrededor del 90% de las alpacas y la totalidad de las llamas está en manos de pequeños productores que paradójicamente constituyen uno de los segmentos menos favorecidos de la población peruana, la misma que vive en estado de extrema pobreza. Habitan las zonas más apartadas del país, carentes de servicios básicos como educación y cuidado de la salud, así como de obras de infraestructura vial que faciliten la comunicación y la adecuada conducción de las actividades tanto de producción como de comercialización de sus productos (FAO, 2005).

En la actualidad, los CSA constituyen el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales de las zonas alto andinas donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies de animales domésticos. Los CSA convierten, con inusual eficiencia, los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad, como son la fibra y la carne, además de los subproductos como las pieles y cueros que tienen múltiples usos industriales y artesanales. El estiércol es otro subproducto valioso que se usa como combustible para la cocción de los alimentos y como fertilizante para los cultivos. La llama, por otra parte, cumple una función muy importante como medio de transporte en los lugares carentes de una adecuada infraestructura vial que, desafortunadamente, son muchos (FAO, 2005).

Los índices productivos de fibra van de 3 a 6 libras por cabeza al año y la producción de carne, de 20 a 30 kilogramos por cabeza. Estos índices productivos son bajos como consecuencia de las inadecuadas técnicas de manejo de pastos y manejo sanitario de alpacas. A su vez, esto último trae como resultado la pérdida de la diversidad genética y un deterioro de la calidad y bajos precios de sus productos (Moya y Torres, 2008).

Dentro de la producción de alpacas, son presentes limitantes las enfermedades infecciosas y parasitarias, mismas que medran la salud del animal y, en consecuencia, disminuyen su rendimiento económico (Fundación Suyana, 2010). En general, las enfermedades infecciosas causan alta mortalidad y morbilidad en crías y adultos, que se traduce en graves pérdidas

económicas, mientras que las enfermedades parasitarias afectan el estado general de los animales, reduciendo la productividad o afectando la calidad de los productos, como la sarcocistiosis que afecta a la carne y los ectoparásitos que afectan la calidad de la fibra (FAO, 2005; Mamani *et al.*, 2009). Las elevadas tasas de mortalidad por causas infecciosas, principalmente en las crías de alpacas, son uno de los factores limitantes para el desarrollo económico de las actividades pecuarias en el mundo andino (Rosadio *et al.*, 2012c; Rodríguez *et al.*, 2015). Las principales causas de muerte en alpacas neonatas en la sierra sur se deben a causas infecciosas, mientras que en la sierra central se deben a causas no infecciosas (Rodríguez *et al.*, 2015). Unos de los factores de mayor impacto económico son la morbilidad y mortalidad de crías de alpaca ocasionados principalmente por enterotoxemia, neumonías y colibacilosis (Ramírez, 2011).

Las especies domésticas de CSA, alpacas y llamas, presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad en los primeros meses de vida (FAO, 2005). La recolección y análisis de informes mensuales de mortalidad neonatal evidencia que las mayores mortalidades ocurren en animales neonatos hasta los 30 días de edad (Rosadio *et al.*, 2012c). La elevada mortalidad está asociada a la sobrepoblación de animales en una majada, una deficiencia o nula planificación, la falta de ingestión del calostro inmediatamente después del parto y al exceso de lluvias (Fundación Suyana, 2010).

Los cuidados que se brindan a las crías recién nacidas se reducen básicamente a la desinfección del ombligo y la ingestión del calostro materno tan pronto como sea posible después del nacimiento. Hay evidencias de que la tardía o insuficiente ingestión del calostro es una de las causas principales de muerte de las crías de alpacas (FAO, 2005).

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. Estos niveles de mortalidad combinados con la baja tasa de natalidad constituyen un freno para cualquier programa de mejoramiento genético por selección debido a la poca disponibilidad de animales que reemplacen a los que se desechen (FAO, 2005).

Desde hace algunos años se han descrito, por separado, las entidades etiológicas que causan mortalidad en las crías de alpacas y llamas debido a procesos entéricos. Algunas de ellas son:

- La diarrea bacilar o enterotoxemia cuyo agente etiológico es el *Clostridium perfringens* tipos A y C, que ataca a los animales mejores alimentados.

- Diarreas atípicas producidas por *Escherichia coli*, que atacan a crías flacas provenientes de madres con poca producción lechera.
- Diarreas causadas por coccidias del género *Eimeria*.
- Agentes transmisores como *Cryptosporidium sp.*, Coronavirus, Rotavirus y *Giardia sp.* comprometidos en procesos entéricos de crías de alpacas que aún no han sido precisados (Pezo *et al.*, 2014).

La frecuencia relativa de las principales causas de mortalidad de alpacas del departamento de Puno son: Enfermedades infecciosas (51.70%), alteraciones orgánicas (24.08%), causas accidentales (13.36%), causas nutricionales (7.83%) y enfermedades parasitarias (3.03%) (Mamani *et al.*, 2009). Las enfermedades que más atacan a las crías de alpaca, convirtiéndose en las causas más frecuentes de sus muertes, son la enterotoxemia y la fiebre pero también se ha registrado una significativa cantidad de ataques de zorros y afecciones mortales ocasionadas por las alteraciones del clima (Moya y Torres, 2008).

2.2 La placenta de los camélidos

El tipo de placenta epiteliocorial de los camélidos previene el pasaje de inmunoglobulinas al feto, por lo tanto, los animales neonatos nacen hipogammaglobulinémicos y su capacidad de resistencia contra los patógenos depende de una adecuada absorción del calostro (Ramírez, 2011).

2.3 Principales enfermedades infecciosas de las crías de alpaca

Las enfermedades infecciosas son una de las mayores limitantes para el desarrollo productivo en las comunidades campesinas, donde unos de los factores de mayor impacto económico son los problemas de morbilidad y mortalidad de crías de alpaca ocasionados principalmente por enterotoxemia, neumonías y colibacilosis (Dionisio *et al.*, 2014).

En el Perú, las enfermedades infecciosas inciden negativamente en el desarrollo de la industria alpaquera, y la enterotoxemia es todavía la principal causa de altas mortalidades, particularmente en explotaciones alpaqueras del sur peruano (Rosadio *et al.*, 2012b).

En otros estudios se ha detectado que la falla en la transferencia de inmunoglobulinas provenientes del calostro constituye la causa principal de muerte neonatal en alpacas debido a su incapacidad de defenderse contra las infecciones (FAO, 2005).

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 (FAO, 2005).

2.3.1 Enteritis Infecciosa Neonatal (diarrea neonatal o colibacilosis)

Las diarreas neonatales, causantes de muertes y reportadas como colibacilosis o enteritis, han sido poco estudiadas en el Perú. La poca información existente evidencia la presencia de numerosos agentes e incluyen al *C. perfringens*, *Eimeria spp.*, *Cryptosporidium spp.* y *Escherichia coli* como potenciales patógenos productores de alteraciones entéricas (Rosadio *et al.*, 2012c). Es una enfermedad importante en llamas y alpacas neonatas, siendo la causa más común de morbilidad entre el nacimiento y el destete, afectando al menos al 23% de las crías (Rodríguez *et al.*, 2015). La enteritis infecciosa afecta a las crías a partir de los tres días de nacidas independientemente de su condición física o corporal. Se le reconoce como un brote o epidemia en potreros o canchas de pastoreo durante la época de parición (Pezo *et al.*, 2014).

La enteritis infecciosa no es fácil de diferenciar porque clínicamente no siempre es posible identificar qué causa las diarreas y, por ello, los tratamientos empleados rara vez logran controlar los procesos de infección. En la actualidad se sabe que aparece generalmente por la interacción de *Clostridium perfringens* tipos A y C y cepas toxigénicas de *Escherichia coli*, y posteriormente también pueden actuar coccidias, sobre todo en animales de más de 30 días de edad (Pezo *et al.*, 2014).

El proceso infeccioso está caracterizado por una alta mortalidad y morbilidad. Al principio no se observa síntomas aparentes y los animales mueren repentinamente. Conforme el proceso avanza, es posible observar animales con diarreas o estreñimiento, deshidratados, con acidosis, opistótonos, postrados, con abdomen abultado, temperatura aumentada hasta 40°C, manifestaciones de dolor y pérdida de peso hasta caquexia. Los animales enfermos desarrollan apetito poco común al ingerir piedrecillas y tierra, por lo que las diarreas son de color oscuro. Durante este proceso es posible que estén actuando *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*

en forma conjunta. Posteriormente, cuando actúan las coccidias, las diarreas se hacen más abundantes y sanguinolentas (Fundación Suyana, 2010; Pezo *et al.*, 2014).

La compleja fisiopatología de la diarrea neonatal está mediada por enterotoxinas bacterianas y virales, bacterias y parásitos inductores de inflamación que colonizan la mucosa, y virus que se multiplican en la mucosa intestinal e inducen la atrofia de las vellosidades (Rodríguez *et al.*, 2015).

En el síndrome diarreico neonatal, la deshidratación juega un papel crucial pues ocasiona el desbalance electrolítico, causa principal de la muerte. Hay un movimiento constante de iones y agua en estómago e intestino; sin embargo, en los casos de diarrea, el intestino delgado es el área de mayor relevancia (Rodríguez *et al.*, 2015).

Las cepas de *E. coli* enteropatógenicas (EPEC) eae y bfp son productoras de diarrea debido a su capacidad de adherirse a los enterocitos, inicialmente en forma laxa, a través del producto bfp y, posteriormente, en una forma más fuerte que elimina las microvellosidades intestinales. Las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) son, teóricamente, más agresivas que las EPEC a consecuencia de genes con capacidad de secretar proteínas altamente tóxicas (vero-toxinas).

La asociación positiva entre presencia de cepas EPEC con signos clínicos diarreicos sugieren causalidad de cuadros diarreicos, pero llama la atención la significativa presencia de cepas EHEC en intestinos hemorrágicos sin expresar factores de adherencia, impidiendo asociar su presencia con las lesiones patológicas descritas (Rosadio *et al.*, 2012c).

2.3.2 Enterotoxemia

La enterotoxemia es una de las enfermedades infecciosas más importante de los CSA tanto en Norteamérica como en Sudamérica, siendo una de las principales causas de mortalidad de las crías durante las primeras semanas de vida. Es una enfermedad endémica en el Perú y presenta brotes o epizootias con altas tasas de mortalidad: ha superado más del 50% de las crías en algunos años en Perú. En un estudio sobre las causas de mortalidad en crías de alpacas a lo largo de seis años en Puno, determinaron una mortalidad del 44% debida a problemas entéricos, especialmente la enterotoxemia (Rosadio *et al.*, 2012a).

La enterotoxemia es la enfermedad de mayor impacto sanitario y económico en la producción alpaquera del Perú (Rosadio *et al.*, 2012a). Se presenta en forma epizootica durante la época de

parición y se encuentra relacionada a factores climáticos, especialmente lluvia abundante, además de deficiencias en el manejo e higiene (Hurtado, 2011).

La enfermedad está producida por la acción de las enterotoxinas de *Clostridium perfringens*, esta bacteria que forma esporas como mecanismo de resistencia (FAO, 2005); sin embargo, en los animales afectados se ha observado otros microorganismos que también son patógenos como la *E. coli* (enterotoxigénica) que produce toxinas y la *Eimeria spp.* (Fundación Suyana, 2010). Esta enfermedad afecta principalmente a crías entre la segunda y novena semana de edad (Rosadio *et al.*, 2012a).

C. perfringens (en especial el tipo A) es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida como parte de la flora normal del suelo y tracto intestinal de animales de sangre caliente (Hurtado, 2011). Microscópicamente, *C. perfringens* es un bacilo Gram positivo grueso, recto, solitario o en pares, rara vez en cadena. Es un organismo anaerobio tolerante, forma esporas. Tiene la capacidad de producir varias enfermedades en animales y el hombre. La virulencia de esta especie está dada por la presencia de exotoxinas, las cuales también determinan el genotipo de la cepa (Hurtado, 2011; Rosadio *et al.*, 2012b).

Las toxinas tipo A de *C. perfringens* mayormente son las más involucradas (Hurtado, 2011). Es ampliamente aceptado que la enterotoxemia raramente es causada por el tipo C (Rosadio *et al.*, 2012b).

La enterotoxemia afecta principalmente a crías de alpacas y llamas entre los 3 a 80 días de edad, siendo las de 14 a 21 días de edad las más susceptibles. Esta enfermedad afecta tanto a crías hembras como a machos; así mismo, las crías de la raza Suri blancas han mostrado verse más afectadas que las crías de la raza Huacaya y de colores (Hurtado, 2011).

Debido a que las crías nacen mayormente durante los meses de enero a marzo, que coincide con la época de lluvias, esta asociación de factores (lluvias abundantes, hacinamiento y animales susceptibles) estaría favoreciendo la presentación de epizootias de enterotoxemia debido a que la extrema humedad del suelo contribuye a la presencia, multiplicación y modificación biológica de esporas y células vegetativas de *C. perfringens* así como también la extrema variación entre temperatura máxima (14°C) y mínima (3°C), que deben soportar las crías a pocos días de nacidas (Hurtado, 2011).

La toxina alfa es una zinc metalofosfolipasa que hidroliza fosfatidil colina y esfingomielina (los cuales se encuentran presentes en la membrana externa de la célula eucariota), lo cual es responsable de su actividad citotóxica, necrótica y hemorrágica. Está conformada por dos dominios: un dominio amino-terminal (dominio N) compuesto de hélices y otro dominio carboxi-terminal (dominio C) compuesto de hojas plegadas. Estos dominios están unidos por una región común flexible. El dominio N contiene el sitio activo de la fosfolipasa C esencial para todas las actividades; mientras que el dominio C podría tener un rol clave en la interacción con la membrana fosfolipídica (Hurtado, 2011).

A pesar de que existe concordancia en aceptar que el tipo A es la principal causa de la enfermedad, todavía persisten discrepancias sobre si la toxina α es la única responsable de las alteraciones patológicas fatales (Rosadio *et al.*, 2012b). Estudios moleculares recientes indican que la mayoría de *C. perfringens* aislados de casos fatales de la enfermedad poseen mayoritariamente genes codificantes de exotoxinas (α , β y β_2) y escasamente el gen de la enterotoxina (Rosadio *et al.*, 2012a).

El cuadro patológico es consecuencia de un cuadro infeccioso primario a nivel intestinal (yeyuno e íleon), que deriva posteriormente en una toxemia generalizada producto de las exotoxinas del *C. perfringens* tipo A o tipo A β_2 . Estas toxinas ocasionan daños irreversibles en el endotelio y sistema nervioso que se traducen en manifestaciones clínicas intestinales y nerviosas de curso rápido que finalizan con la muerte súbita del animal (Rosadio *et al.*, 2012a).

La presentación clínica de la enfermedad corresponde a una toxemia fatal producto de una enteritis hemorrágica o necrótica selectiva del yeyuno e íleon (Rosadio *et al.*, 2012b). Muchas veces, lo único que se puede observar es la muerte súbita, las crías afectadas degeneran rápidamente en ese estado pudiendo mostrar antes anorexia, postración, dolor abdominal (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 observa alteraciones nerviosas manifestadas por convulsiones y estado opistótono, muriendo posteriormente (Hurtado, 2011).

2.3.3 Eimeriosis

La coexistencia de eimeriosis en casos de enterotoxemia y diarreas fatales ha sido previamente reportada, de allí que la identificación de estructuras parasitarias similares asociadas a cambios patológicos intestinales en el 30% de los casos estudiados permiten indicar que las infecciones por *Eimeria* podrían ser uno de los factores desencadenantes o predisponentes para el establecimiento de la enterotoxemia de la alpaca (Rosadio *et al.*, 2012b).

Se ha realizado estudios para identificar posibles agentes biológicos desencadenantes de patología intestinal de animales muertos por enterotoxemia. Los animales estudiados procedían de Cusco, Puno y Arequipa. Los estudios microscópicos revelaron cambios patológicos en la superficie del lumen del yeyuno e íleon. Se observó necrosis severa asociada con acortamiento y fusión de las vellosidades intestinales, así como congestión difusa y hemorragia focalizada de la mucosa. En el 31% de las muestras se observó la presencia de abundantes estructuras parasitarias inmaduras correspondientes a *Eimeria macusaniensis* comprometiendo la mucosa y el epitelio de las glándulas crípticas en yeyuno e íleon (Rosadio *et al.*, 2012b).

El *C. perfringens* y algunas especies de *Eimeria* en forma independiente pueden establecerse y causar infecciones agudas fatales en animales neonatos, pero la coexistencia de ambos patógenos en el ambiente intestinal puede resultar en un aumento de las capacidades patológicas de cualquiera de estos agentes o uno de ellos puede predisponer la mayor capacidad infectiva del otro. En esta posible interacción, el *Clostridium* parecería no ser el agente predisponente a infecciones eimeriales pues la destrucción de los enterocitos podría reducir la población celular necesaria para mantener una adecuada replicación coccidial. Sin embargo, los efectos citopáticos inherentes a la multiplicación coccidial podrían muy bien facilitar los nutrientes necesarios para iniciar la multiplicación bacteriana y subsecuente producción y absorción de toxinas potencialmente patogénicas (Rosadio *et al.*, 2012b).

La asociación entre *Eimeria* y *Clostridium* ha sido descrita en procesos enterotoxigénicos en camellos, pero es un concepto nuevo en camélidos sudamericanos (Rosadio *et al.*, 2012c).

2.4 Generalidades sobre inmunidad

El cuerpo del animal vivo contiene todos los componentes necesarios para sustentar la vida: es tibio, húmedo y abundante en nutrimentos. Por ello, sus tejidos resultan en extremo atractivos

para una amplia variedad de microorganismos. Por otra parte, los tejidos de animales vivos y sanos son resistentes a invasiones microbianas gracias a una extensa variedad de mecanismos de defensa interrelacionados (Tizard, 2002). Sin embargo, los camélidos de todo el mundo son considerados especies que poseen características particulares en su sistema inmunitario (Ramírez, 2011).

Vivimos en un mundo potencialmente hostil, atestado por un conjunto confuso de agentes infecciosos. Con gusto nos utilizarían para la propagación de sus genes si no hubiéramos desarrollado también un conjunto de mecanismos de defensa por lo menos tan eficaz e ingenioso. Estos mecanismos de defensa pueden establecer un estado de inmunidad contra la infección (Roitt y Delves, 2003).

El cuerpo cuenta con múltiples líneas defensivas. Las principales y más obvias son las barreras físicas contra la invasión. Con el tiempo, el invasor llega a vencer los obstáculos físicos. A partir de ese punto, entra a tallar la segunda línea de defensa, que consiste en los químicos y células conocidos de manera colectiva como sistema inmunitario innato. Este mecanismo se basa en que los microorganismos invasores son químicamente muy distintos de los componentes corporales sanos (Tizard, 2002).

Las reacciones inflamatorias tampoco constituyen la solución definitiva para defender el cuerpo; en otras palabras, se requiere un sistema que aprenda a reconocer a los invasores cuando vuelva a encontrarse con ellos para poder reaccionar aun con mayor rapidez y eficacia. Este tipo de reacción adaptativa es la función del sistema de inmunidad adquirida. A medida que el animal adquiere inmunidad específica contra un invasor, la posibilidad de que ese mismo vuelva a invadir con éxito se reduce considerablemente (Tizard, 2002).

Cuando nace un mamífero, emerge del útero estéril hacia un ambiente en el que se expone de inmediato a una multitud de microorganismos. Para sobrevivir, el neonato debe ser capaz de controlar la invasión microbiana en muy poco tiempo. Necesitan ayuda para defenderse durante ese tiempo, esta ayuda temporal la brinda la madre en forma de anticuerpos y, tal vez, de linfocitos T transmitidos a través del calostro. También se transfiere linfocitos maternos al feto a través de la placenta o a los neonatos en el calostro y por migración transintestinal (Tizard, 2002).

2.4.1 Sistema inmune innato

Si los microorganismos ingresan al organismo, comienza a actuar dos operaciones defensivas importantes: el efecto destructor de factores químicos solubles y el mecanismo de fagocitosis. El organismo provee un medio interno muy complejo y los fagocitos se enfrentan constantemente con una extraordinaria variedad de células y moléculas solubles. Deben contar con mecanismos que les permitan distinguir estos componentes propios inocuos de los agentes microbianos lesivos y potencialmente peligrosos. No solo se debe reconocer las infecciones, sino también es necesario generar una señal que indique “peligro” (Roitt y Delves, 2003).

Se ha descubierto varios sistemas antimicrobianos relativamente inespecíficos que son innatos. Por ejemplo, el moco secretado por las membranas que revisten las superficies internas del organismo actúa como una barrera protectora que bloquea la adherencia de las bacterias a las células epiteliales (Roitt y Delves, 2003).

2.4.2 Sistema inmune adquirido

El sistema inmune adquirido constituye la máxima defensa del cuerpo. Es un sistema de defensa de eficacia sorprendente, que no solo reconoce y destruye a los invasores extraños, sino que también retiene el “recuerdo” del encuentro (Tizard, 2002).

El sistema inmune adquirido, o también denominado adaptativo, posee recursos más específicos como los linfocitos T y B, los cuales median la eliminación de patógenos a través del desencadenamiento de vías de respuesta celulares y/o humorales, originando además memoria inmunológica (More, 2013).

Nuestros adversarios microbianos poseen oportunidades notables para desarrollar estrategias, por medio de mutaciones, que les permitan evadir nuestras defensas inmunitarias innatas. El organismo necesita diseñar mecanismos de defensa dirigidos individualmente contra cada uno de estos microorganismos, sin considerar su número. Eso representa un desafío (Roitt y Delves, 2003).

El sistema de inmunidad adquirida tiene cuatro componentes: células capaces de atrapar y procesar el antígeno para que pueda ser reconocido de manera eficaz, células que se unen y reaccionan al antígeno procesado, células productoras de anticuerpos o que participan en las

inmunorreacciones celulares contra el antígeno, y células que retienen el recuerdo del suceso y reaccionan con rapidez (Tizard, 2002).

Aunque hay diferencias únicas, el sistema inmune de camélidos es más similar en composición al sistema inmune de rumiantes. Los anticuerpos monoclonales que identifican los aparentes ortólogos de clusters de diferenciación (CD) conocidos exhiben el mismo patrón de expresión que se observa en terneros. Los patrones de expresión de moléculas MHC tipos I y II fueron idénticos a los observados en rumiantes. La expresión de moléculas de diferenciación de leucocitos fue similar o idéntica a los patrones de expresión observados en rumiantes y otras especies. Con respecto a alpacas y llamas, los anticuerpos monoclonales reactivos con leucocitos de llamas fueron examinados para ver cuáles reaccionaban con moléculas ortólogas en alpacas. Todos los anticuerpos monoclonales otorgaron patrones idénticos a los obtenidos con leucocitos de llamas (Davis *et al.*, 2000).

2.5 Inmunidad en mucosas

La principal puerta de entrada para los microorganismos son las superficies corporales como la piel y las mucosas. En ese sentido, el tracto intestinal se conforma como una de las principales puertas de entrada para los microorganismos potencialmente patógenos (More, 2013); sin embargo, aunque los mamíferos poseen una amplia variedad de mecanismos de defensa en el interior de los tejidos, es en las superficies corporales donde los microorganismos invasores se detectan inicialmente y donde son en su mayor parte repelidos o destruidos (Tizard, 2002).

El tracto intestinal se encuentra repleto de folículos organizados y elementos linfoides sensibilizados y no sensibilizados como linfocitos B, T, células plasmáticas y otros tipos celulares junto con los anticuerpos, que están envueltos en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune de mucosas, los cuales se constituyen como mecanismos altamente específicos (More, 2013). Estos tejidos linfoides se conocen como tejido linfoide asociado al intestino (GALT). A diferencia de los ganglios linfáticos, el GALT no recibe antígenos extraños de la linfa aferente, sino que los toma directamente de la luz (Tizard, 2002).

En cuanto al sistema inmune de mucosa del intestino, éste presenta propiedades únicas como estar expuesto a una gran variedad y cantidad de antígenos, desarrollar una actividad inmunológica permanente y mantener un microambiente fisiológicamente desviado hacia respuestas antiinflamatorias. La actividad conjunta de los sitios inductivos 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 (Ramírez, 2011).

La IgA es sintetizada por células plasmáticas que se encuentran ubicadas en la submucosa; ello ocurre como respuesta a la estimulación antigénica local. Su modo de acción más importante consiste en evitar la adherencia de las bacterias y los agentes virales a las superficies epiteliales (Tizard, 2002; Ramírez, 2011).

Desde el nacimiento, tanto en yeyuno como en íleon, se observa organizaciones linfoides asociadas a mucosa intestinal bien definidas como las Placas de Peyer y folículos linfoides pequeños en baja densidad, así como linfocitos intraepiteliales en la submucosa (Roca *et al.*, 2014). Las placas de Peyer son los tejidos linfoides mayores de las mucosas (Tizard, 2002).

Las placas de Peyer consisten en masas de linfocitos dispuestos en folículos y cubiertos por un epitelio que contiene células epiteliales especializadas, las células M (células con micropliegues). Estas últimas captan antígenos de la luz intestinal y, como eficaces células presentadoras de antígenos, los presentan directamente a los linfocitos contenidos en el interior de la placa (Tizard, 2002).

En el caso de las alpacas, el tejido linfoide asociado a mucosa intestinal está estructuralmente completo al nacimiento, pero es funcional con los primeros contactos con los antígenos de la flora microbiana del intestino (Roca *et al.*, 2014).

Actualmente hay una limitada información científica sobre el rol del sistema inmune relacionado a mucosas, lo que hace difícil establecer terapias adecuadas para el control y la prevención de enfermedades como la enterotoxemia, neumonía y colibacilosis (Ramírez, 2011). La escasa información publicada referente al sistema inmunológico de los camélidos, particularmente en relación a la inmunidad de mucosas, hace difícil describir las características únicas que las diferencian de otras especies ya que la función de este tipo de inmunidad es independiente del aparato inmune sistémico (Ramírez, 2011).

2.6 Inmunidad celular

Las células fagocíticas de los mamíferos pertenecen a dos sistemas complementarios, uno de ellos, el sistema mieloide, está formado por células polimorfonucleares que actúan pronto pero que no pueden mantener un esfuerzo sostenido; el segundo sistema, de fagocitos

mononucleares, está formado por células que actúan con más lentitud pero son capaces de fagocitosis repetidas. Los neutrófilos son el tipo celular más importante del sistema mieloide, no pueden dividirse, actúan capturando y destruyendo partículas extrañas a través de la fagocitosis. Por otro lado, los macrófagos tienen un solo núcleo redondeado y son células que fagocitan con avidez. Lo más importante de los macrófagos es que procesan antígeno en preparación para la respuesta inmunitaria específica (Tizard, 2002).

Muchos microorganismos viven en el interior de las células del huésped, donde es imposible que los alcancen los anticuerpos humorales. Para manejar esta situación, se desarrolló un sistema inmune totalmente distinto, basado en una subpoblación diferenciada compuesta por células T. Dado que están especializadas para operar contra células portadoras de microorganismos intracelulares, las células T solo reconocen el antígeno cuando se encuentra en la superficie de una célula del organismo. En consecuencia, los receptores de superficie de las células T reconocen el antígeno más un marcador de superficie que informa al linfocito T que está en contacto con otra célula. Estos marcadores celulares pertenecen a un grupo importante de moléculas denominadas complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Ahora las células T vírgenes o no estimuladas deben ser presentadas al antígeno y al MHC mediante una célula dendrítica especial presentadora de antígeno antes de que puedan iniciarse en los ritos de una respuesta primaria (Roitt y Delves, 2003).

2.7 Reconocimiento de antígenos

A fin de unirse a una molécula extraña, los receptores de superficie celular del sistema inmunitario deben reconocer su forma. En consecuencia, las moléculas muy flexibles que no tienen forma fija son antígenos débiles. En general, las proteínas ajenas son los mejores antígenos. La estabilidad estructural es una característica importante de un buen antígeno (Tizard, 2002).

Todos los anticuerpos monoclonales que detectaban los epítopos de un solo antígeno se asignaron a un grupo de diferenciación (CD). La proteína denominada CD4 está asociada a linfocitos que “ayudan” en la reacción inmunitaria, mientras que otra proteína, la CD8, se encuentra en linfocitos que matan células anormales (Tizard, 2002).

2.8 Procesamiento de antígenos

El procesamiento del antígeno es la conversión de proteínas naturales en péptidos asociados a glucoproteínas receptoras especializadas (MHC). Este proceso consiste en la introducción de antígenos proteínicos exógenos en vesículas de células presentadoras de antígenos (APC) o en la síntesis de antígenos en el citosol, la degradación proteolítica de estas proteínas en péptidos, la unión de los péptidos a moléculas del MHC y la muestra de los complejos péptido-MHC en la superficie de la APC para su reconocimiento por los linfocitos T (Tizard, 2002). De este modo, estas vías de procesamiento toman muestras de proteínas extracelulares e intracelulares, y las moléculas del MHC enseñan los péptidos derivados de proteínas normales propias y proteínas extrañas para la vigilancia de los linfocitos T (Abbas *et al.*, 2015).

En general, los antígenos proteicos endógenos se procesan para la presentación por MHC clase I, mientras que los antígenos proteicos exógenos, por MHC clase II. Sin embargo, el procesamiento de antígenos para la presentación por la clase II no está confinado a las proteínas solubles captadas del exterior, sino que también puede abarcar microorganismos cuyos antígenos alcanzan las estructuras lisosómicas, ya sea después de una fagocitosis directa o de la cohabitación intracelular prolongada. Existe la necesidad de que los antígenos se asocien con las moléculas clase I o II del MHC para que los linfocitos T puedan reconocerlos (Roitt y Delves, 2003).

2.8.1 MHC

Las moléculas clase I del MHC están constituidas por una cadena polipeptídica pesada, de 44 kDa, unida de manera no covalente a un polipéptido más pequeño de 12kDa. La parte más grande de la cadena pesada está organizada en tres dominios globulares que protruyen de la superficie celular, una porción hidrófoba fija la molécula en la membrana y una corta secuencia hidrófila transporta el extremo C-terminal al interior del citoplasma. Las moléculas clase II del MHC también son glucoproteínas transmembrana, en este caso constituidas por cadenas polipeptídicas α y β de 34kDa y 29kDa de peso molecular, respectivamente (Roitt y Delves, 2003).

Las moléculas del MHC desempeñan una función crucial en la segregación de los antígenos del exterior de la célula y presentándolos a diferentes poblaciones de linfocitos T (Abbas *et al.*, 2015). No hay dudas de que este papel en la respuesta inmune es de importancia extrema y, en

este aspecto, la región del MHC con alto polimorfismo representa una respuesta de la especie para aumentar al máximo la protección contra diversos microorganismos (Roitt y Delves, 2003).

2.9 Presentación del antígeno

Hay muy pocos linfocitos T vírgenes específicos frente a cualquier antígeno, y este pequeño número debe ser capaz de localizar el antígeno extraño y eliminarlo. Los microbios y otros antígenos pueden localizarse en casi cualquier lugar del cuerpo. Es imposible que los pocos linfocitos T específicos frente a cualquier antígeno patrullen constantemente por todos los posibles tejidos por los que los antígenos pueden entrar o producirse. La solución a este problema requiere un sistema especializado de captura y transporte del antígeno hasta los órganos linfáticos a través de los que circulan los linfocitos T y en los que pueden iniciarse las respuestas. Las células presentadoras de antígenos (APC) exponen complejos péptido-MHC para su reconocimiento por los linfocitos T, y también proporcionan estímulos adicionales necesarios para obtener respuestas completas de los linfocitos T (Abbas *et al.*, 2015).

Las APC que presentan antígenos a los linfocitos T también reciben señales de estos linfocitos que aumentan su función presentadora del antígeno. En particular, los linfocitos T CD4⁺ que activan el reconocimiento del antígeno y la coestimulación expresan moléculas de superficie, sobre todo una llamada ligando de CD40 (CD 154), que se une al CD40 en las células dendríticas y los macrófagos, y los linfocitos T secretan citocinas como el interferón 7 (IFN-7), que se une a sus receptores en estas APC (Abbas *et al.*, 2015). Los macrófagos y los linfocitos B también funcionan como APC, pero, sobre todo, de linfocitos T CD4⁺ cooperadores previamente activados en lugar de linfocitos T vírgenes (Roitt y Delves, 2003).

En las respuestas inmunitarias celulares, los macrófagos presentan el antígeno de los microbios fagocitados a los linfocitos T efectoras, que responden activando los macrófagos para que maten a los microbios (Abbas *et al.*, 2015).

2.10 El linfocito T

Los linfocitos son las células encargadas de reconocer antígenos extraños y montar inmunorreacciones. Expresan una gran diversidad de receptores para el antígeno capaces de

reconocer una amplia variedad de sustancias extrañas. Son pequeñas células redondeadas que se encuentran en la sangre y en órganos linfoides (Tizard, 2002; Abbas *et al.*, 2015).

Los linfocitos se encuentran diseminados por todo el organismo, la mayor parte se concentra en ganglios linfáticos, bazo y médula ósea. En realidad, constituyen una mezcla diversa de poblaciones celulares, cada una con propiedades y funciones características. Los primeros estudios en animales timentomizados demostraron que la timentomía neonatal ocasiona la pérdida de una fracción considerable de los linfocitos del organismo. Estos se denominan linfocitos T. Cuando los linfocitos T abandonan el timo, se acumulan en la paracorteza de los ganglios linfáticos, las vainas linfoides periarteriolas del bazo y las regiones interfoliculares de las placas de Peyer. En términos generales, los linfocitos T son la población linfocítica circulante que predomina y representan hasta 80% de los linfocitos en sangre periférica (Tizard, 2002).

Los linfocitos T, las células de la inmunidad celular, reconocen los antígenos de los microorganismos intracelulares y sirven para destruir estos microbios o las células infectadas. Estas células no producen moléculas de anticuerpo. Sus receptores del antígeno son moléculas de membrana distintas de ellos, pero dotadas de una estructura afín (Abbas *et al.*, 2015).

Las principales funciones de los linfocitos T son erradicar las infecciones producidas por los microbios intracelulares y activar otras células, como los macrófagos y los linfocitos B (Abbas *et al.*, 2015). Modelos de ratones inmunodeficientes infectados con *Cryptosporidium parvum* han mostrado que los linfocitos T son importantes en la prevención de la infección intestinal crónica (Wyatt *et al.*, 1997).

Para asegurar que los linfocitos T interactúen con otras células y no con los antígenos solubles, los receptores del linfocito T para el antígeno están diseñados para ver antígenos presentados por moléculas de la superficie de las células y no antígenos situados en microbios ni antígenos libres en la circulación o los líquidos extracelulares (Abbas *et al.*, 2015).

2.11 Receptor de linfocito T (TCR)

Las células que median las inmunorreacciones celulares son los llamados linfocitos T y las células que regulan las inmunorreacciones humorales son los linfocitos B. Ambos tipos de células cuentan con receptores específicos para los antígenos extraños y por tanto son capaces

de reconocer al antígeno procesado y reaccionar adecuadamente contra él (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003).

Los receptores de antígeno son las estructuras más importantes en la superficie de los linfocitos, denominados receptores de linfocitos T (TCR) y receptores de linfocitos B (BCR). Ambos son estructuras complejas que contienen muchas proteínas diferentes. Algunas de éstas se utilizan para enlazar antígenos; otras, para la transducción de señales (Tizard, 2002). El reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T se lleva a cabo gracias a los TCR (Gertner *et al.*, 2007).

Cuando por fin se logró rastrear su origen, el receptor de la célula T específico para antígeno se identificó como una molécula ligada a la membrana, compuesta por dos cadenas unidas por puente disulfuro, α y β . Cada cadena TCR se divide en cuatro dominios: dominio variable, dominio constante, el tercer dominio (transmembrana) y el dominio C-terminal (intracitoplasmático). Para la especificidad del antígeno se requieren ambas cadenas, α y β (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003).

Puesto que cada TCR consiste en cadenas peptídicas pareadas, los dos dominios variables de cada cadena forman en conjunto un surco que puede unirse a péptidos antigénicos. La especificidad de la unión entre un TCR y un péptido antigénico es determinada por la forma que generan los dos dominios variables (Tizard, 2002).

Después de la identificación del receptor $\alpha\beta$ de la célula T, aparecieron publicaciones acerca de la existencia de un segundo tipo de receptor compuesto por cadenas γ y δ (gamma y delta). En los seres humanos, las células $\gamma\delta$ representan solo el 0.5% - 15% de las células T en sangre periférica, pero muestran un predominio mayor en el epitelio intestinal y en la piel. En contraposición, entre el 30% y el 80% de las células T de sangre en los rumiantes son $\gamma\delta$; esto refleja características fisiológicas algo diferentes, pero implica que estas células pueden desempeñar un papel importante en las respuestas inmunes. En general, las células T $\gamma\delta$ parecen tener una predilección marcada por el reconocimiento de ciertos tipos de antígenos microbianos, varios de los cuales son componentes de micobacterias, que incluyen moléculas de lípidos y glucolípidos así como proteínas del choque térmico (Roitt y Delves, 2003).

El complejo reconocimiento del antígeno por parte de la célula T tiene como trabajo enviar una señal cuando se une al antígeno. Esta señal la envía al interior del linfocito T mediante un complejo asociado de polipéptidos transmembrana (CD3) con el fin de instruir a la célula para

que despierte de su estado latente G0 y haga algo útil, como convertirse en una célula efectora. En todas las células T competentes, el receptor para el antígeno está en íntima relación con el CD3 (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003).

Otra proteína, CD4, solo existe en los linfocitos T que reconocen el antígeno exógeno procesado, es decir, los linfocitos T de ayuda. Actúa como un receptor de linfocitos T para moléculas MHC clase II. La molécula CD4 no se restringe a los linfocitos T de ayuda, se ha identificado en monocitos, macrófagos y eosinófilos en algunas especies y en neutrófilos en el perro. Por otro lado, otra proteína, la proteína CD8, solo existe en los linfocitos T que atacan y matan células anormales, es decir los linfocitos T citotóxicos. El CD8 es un receptor para moléculas MHC clase I (Tizard, 2002).

2.11.1 Generación de diversidad para el reconocimiento del antígeno

El sistema inmune debe ser capaz de reconocer virtualmente cualquier patógeno que haya surgido o pueda surgir. La imponente solución genética al problema de anticiparse a un futuro imprevisible involucra la generación de millones de receptores específicos para antígenos diferentes. La variedad de TCR disponibles en un animal es regulada de manera cuidadosa. Un animal debe poseer poblaciones de linfocitos T capaces de reaccionar al mayor número posible de antígenos extraños diferentes, pero al mismo tiempo, dichas poblaciones no deben unirse a autoantígenos. Afortunadamente, los segmentos génicos individuales de los receptores pueden formar una multiplicidad de receptores específicos para el antígeno en las células B y T (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003).

Los linfocitos no expresan el mismo inmunofenotipo en todas las fases de su ciclo vital. Esto depende de su madurez, su estado de activación y su diferenciación (Tizard, 2002).

2.12 Genética del TCR

Puesto que los microorganismos surgen y evolucionan con rapidez, el sistema inmunitario debe estar en posibilidades de reaccionar no solo a los microorganismos existentes sino también, dentro de lo razonable, a los que van apareciendo. La amplia gama de respuestas inmunitarias específicas hace necesaria la existencia de un gran número de receptores de linfocitos T (TCR) específicos para cada tipo de antígeno (Tizard, 2002). La imponente solución genética al

problema de anticiparse a un futuro imprevisible involucra la generación de millones de receptores específicos para antígenos diferentes. Ya que esto excede en gran medida la cantidad de genes en el organismo, existen los mecanismos surgidos para generar la tremenda diversidad a partir de mezclas de genes tan limitadas. Todo lo que se requiere para la producción de receptores de antígenos es que los genes implicados sean “seleccionados” por exposición a un antígeno específico. Una vez que los genes apropiados son activados, pueden ser transcritos en ARN y traducidos en la molécula receptora apropiada en linfocitos T (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003).

La capacidad de un TCR de unirse a un antígeno es determinada por la forma de su sitio de unión a antígeno. La forma de este sitio, y por tanto su capacidad de adherirse al antígeno, depende del plegamiento de sus cadenas peptídicas, que a su vez es determinado por su secuencia de aminoácidos, y esta secuencia es determinada por la secuencia de bases en los genes que codifican esa molécula. Cada aminoácido en una cadena peptídica influye en sus aminoácidos vecinos, lo que define su orientación relativa (Tizard, 2002).

La diversidad de la estructura de los TCR se genera en gran parte de la misma manera que en las inmunoglobulinas (Ig), aunque con algunas diferencias interesantes y significativas (Tizard, 2002). El reordenamiento de genes de la Ig y del TCR representa un tipo especial de recombinación no homóloga del ADN, mediada por las actividades coordinadas de varias enzimas, algunas de las cuales se encuentran solo en los linfocitos en desarrollo, mientras que otras son enzimas ubicuas para la reparación de roturas en el ADN bicatenario (Abbas *et al.*, 2015). En este proceso, bajo la guía de los productos de los genes activadores de la recombinación (RAG1 y RAG2), los segmentos génicos variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) son reordenados. Este proceso es crítico para la generación de linfocitos T y B, y ocurre en los órganos linfáticos primarios (Karunakaran, 2014).

2.12.1 Genética de las inmunoglobulinas

Existe tres familias de genes que codifican cadenas peptídicas de inmunoglobulina, cada una se localiza en un cromosoma distinto. Una familia codifica las cadenas ligeras kappa, otra las cadenas ligeras lambda y una más las cadenas pesadas. Cada una de estas familias consta de un gran número de segmentos génicos que codifican las regiones variables (genes V), uno o más segmentos que codifican las regiones constantes (genes C), y un número variable de segmentos génicos pequeños llamados segmentos J (de unión) o D (de diversidad). La diversidad de los

anticuerpos es consecuencia de la recombinación entre estos segmentos génicos. En sentido estricto, estas secuencias de ADN son exones; sin embargo, por convención se les llama genes o segmentos génicos. El mecanismo más obvio para generar diversidad en la región V de las inmunoglobulinas consiste en tomar al azar un segmento génico V a partir del conjunto disponible, y unirlo a otro segmento génico J elegido también al azar. Puesto que existen múltiples segmentos génicos V y J disponibles, el número de combinaciones posibles es muy grande (Tizard, 2002).

2.12.1.1 Adición o eliminación de nucleótidos en las uniones de segmentos génicos

La mayor contribución a la diversidad de receptores para el antígeno la realiza la eliminación o adición de nucleótidos en las uniones de los segmentos V y D, D y J, o V y J en el momento en que estos segmentos se unen. Una forma en que esto ocurre es cuando las endonucleasas eliminan nucleótidos de las secuencias en línea germinal en los extremos de los segmentos génicos que se recombinan. Además pueden añadirse secuencias nuevas de nucleótidos, no presentes en la línea germinal, en las uniones (Figura 1) (Abbas *et al.*, 2015).

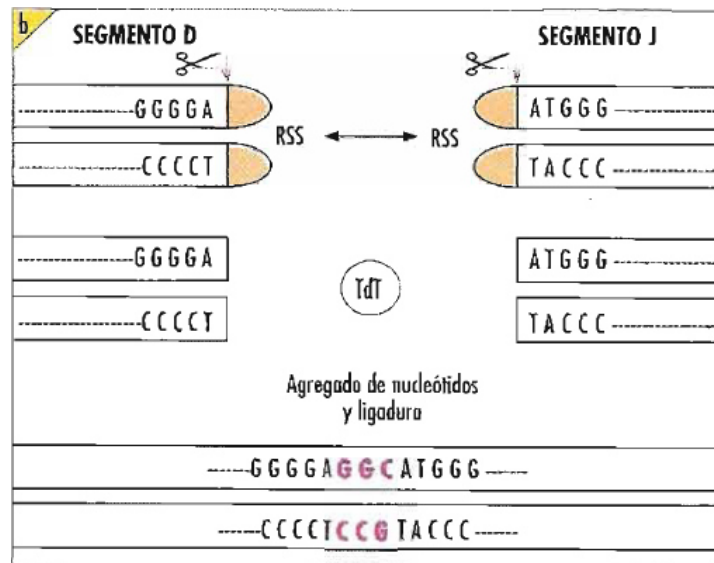


Figura 1. Adición de nucleótidos en la unión de segmentos génicos, sin la presencia de una secuencia molde (Roitt y Delves, 2003. *Inmunología Fundamentos*. 10a ed. Editorial médica Panamericana. Madrid – España).

En otros casos, los segmentos codificadores (por ejemplo, segmentos génicos V y J) escindidos por Rag-1 forman asas de la horquilla cuyos extremos son escindidos a menudo de forma asimétrica por la enzima Artemisa, de manera que una cadena de ADN es más larga que la otra. La cadena más corta debe extenderse con nucleótidos complementarios hasta alcanzar el tamaño de la cadena más larga antes de ligar los dos segmentos. La cadena más larga sirve de plantilla para la adición de secuencias cortas de nucleótidos llamados nucleótidos P, y este proceso introduce nuevas secuencias en las uniones V-D-J(Figura 2) (Abbas *et al.*, 2015).

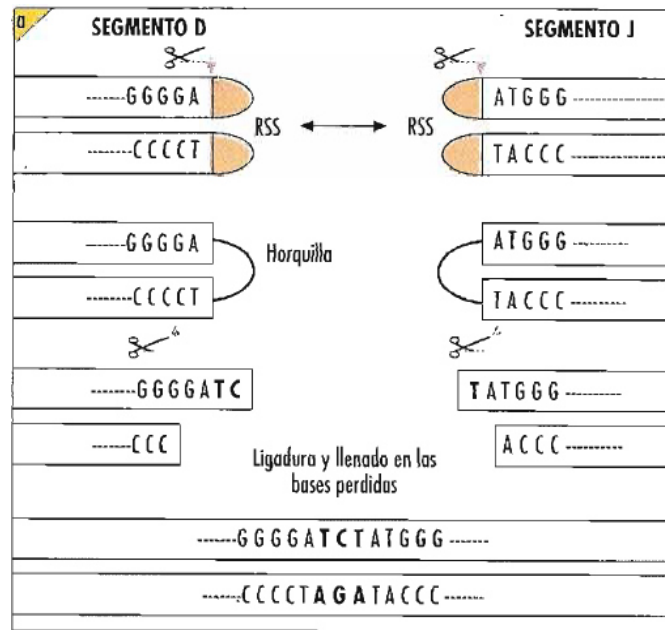


Figura 2. Adición de nucleótidos en la unión de segmentos génicos, usando la cadena de ADN más larga como molde (Roitt y Delves, 2003. Inmunología Fundamentos. 10a ed. Editorial médica Panamericana. Madrid – España).

Mientras que estos mecanismos agregan nucleótidos a la secuencia, puede crearse aún más diversidad por la actividad de las nucleasas en los extremos de la hebra expuestos a la eliminación de nucleótidos. Estas maniobras aumentan en gran medida el repertorio, especialmente importante para los genes gamma (γ) y delta (δ) del receptor de la célula, que de otro modo es bastante limitado en cantidad (Roitt y Delves, 2003).

Otra táctica para conseguir una mayor variación del repertorio de la línea germinal comprende recombinaciones limítrofes variables de V, D y J para producir diferentes secuencias de unión (Figura 3) (Roitt y Delves, 2003).

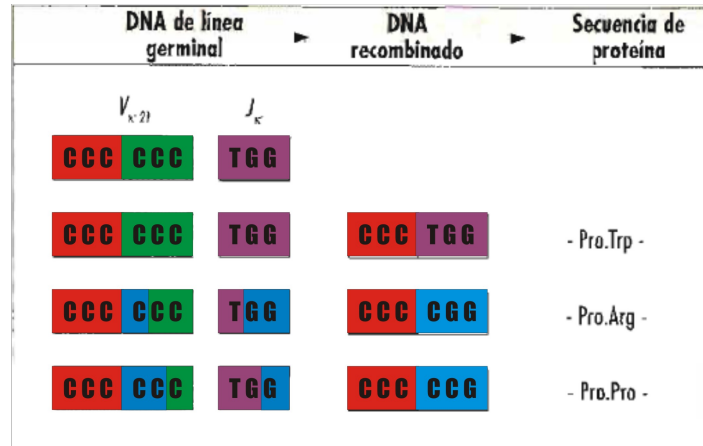


Figura 3. Diversidad de uniones entre dos segmentos de línea que produce tres variantes de secuencia (Roitt y Delves, 2003. Inmunología Fundamentos. 10a ed. Editorial médica Panamericana. Madrid – España).

2.12.1.2 Diversidad combinatoria

El reordenamiento de los segmentos génicos en el formato V(D)J acerca múltiples segmentos génicos en línea germinal que pueden combinarse de forma aleatoria, y diferentes combinaciones producen diferentes receptores para el antígeno (Abbas *et al.*, 2015). El máximo número posible de combinaciones de estos segmentos génicos es el producto del número de segmentos génicos V, J y (si está presente) D en cada locus del receptor para el antígeno; es decir, la diversidad aumenta en proporción geométrica (Roitt y Delves, 2003; Abbas *et al.*, 2015).

Después de la síntesis de las proteínas del receptor para el antígeno, la diversidad combinatoria aumenta aún más por la yuxtaposición de dos regiones V diferentes generadas de forma aleatoria (es decir, V_H y V_L en moléculas de Ig, y V_α y V_β en moléculas del TCR). El grado real de diversidad combinatoria en los repertorios de Ig y TCR expresados en cualquier sujeto es probablemente menor que el máximo teórico. Esto se debe a que no todas las recombinaciones de segmentos génicos tienen las mismas probabilidades de producirse y a que no todas las

parejas de cadenas pesadas y ligeras de Ig o de cadenas α y β del TCR pueden formar receptores funcionales (Abbas *et al.*, 2015).

2.12.1.3 Diversidad en la región D

Mecanismos adicionales se relacionan de manera específica con la secuencia de la región D, particularmente en el caso de los genes TCR δ , donde el segmento D puede leerse en tres marcos diferentes y pueden unirse dos segmentos D; tales combinaciones DD producen una tercera región determinante de complementariedad más larga (CDR3) que se encuentra en otros TCR.

Dado que en las diversas cadenas del receptor, el CDR3 está compuesto en esencia por regiones entre los segmentos de V(D)J, donde los mecanismos de diversidad de unión pueden introducir un grado muy alto de variabilidad de aminoácidos, se puede ver la razón por la que esta asa hipervariable por lo común es el determinante máximo de la delicada especificidad de unión a estas moléculas (Roitt y Delves, 2003).

2.12.1.4 Ensamblaje de cadenas ligeras

Para el ensamblaje de las cadenas ligeras, hay que unir un segmento V, uno J y uno C. Estos segmentos están separados por intrones. Cuando los linfocitos B se desarrollan, una de las primeras actividades que realizan es formar un asa con esos intrones para cortarlos y eliminarlos. Los segmentos V y J poseen sitios especiales en cada extremo que guían la enzima cortadora. El intrón por excluir es separado por una recombinasa, y los extremos libres del ADN se unen de manera que los segmentos génicos formen una secuencia continua que deja al segmento V unido directamente al J (Tizard, 2002).

La recombinación de segmentos génicos se realiza en dos fases. En primer lugar, segmentos V y J elegidos al azar se unen para formar una región V completa. Los genes V y J unidos permanecen separados del gen C hasta que son transcritos a ARNm. La cadena ligera completa se transcribe a partir de ese ARN mensajero (Tizard, 2002).

2.12.1.5 Ensamblaje de cadenas pesadas

El ensamblaje de la región V de una cadena pesada es más complejo debido a la presencia de segmentos génicos D entre los segmentos V y J. Por tanto, para construir esta región V, es necesario empalmar los segmentos V_H, D y J_H. Estos segmentos también se unen en un orden específico. Así, primeramente D se une a J_H y luego se añade V_H. Después de la transcripción, determinadas enzimas suprimen los intrones restantes y el ARNm de V-D-J-C se transcribe para formar la cadena pesada. Si bien la selección aleatoria de segmentos génicos provenientes de dos o tres conjuntos distintos genera un gran número de regiones V diferentes, no todas las combinaciones de segmentos aportan anticuerpos útiles (Tizard, 2002).

2.12.2 Diversidad de los receptores de linfocitos T

Al igual que en las inmunoglobulinas, las cuatro cadenas peptídicas que conforman los dos tipos de TCR pueden unirse a antígenos específicos. Dicha capacidad resulta del hecho de que cada una de ellas tiene una región variable unida a una región constante (Tizard, 2002). Como en las moléculas de Ig, los dominios V y C del TCR asumen una estructura terciaria plegada de Ig y, por ello, el TCR es un miembro de la superfamilia de Ig (Abbas *et al.*, 2015).

Las cuatro cadenas peptídicas de los TCR son codificadas por tres familias diferentes de genes (α/δ , β y γ). Las tres familias contienen segmentos V, J y C, y las familias beta y delta también contienen segmentos D. Cada familia génica para TCR contiene dos o más genes de la región constante. En la familia alfa-delta, los dos genes de la región C son diferentes desde el punto de vista funcional y estructural, de manera que uno codifica C _{α} y el otro C _{δ} . El número de genes C _{γ} varía según la especie (Tizard, 2002). Las regiones variables de la cadena liviana se forman a partir de los segmentos V y J, y las regiones variables de la cadena pesada a partir de los segmentos V, D y J. Las enzimas RAG-1 y RAG-2 reconocen secuencias señal de recombinación (RSS) adyacentes a las secuencias codificadoras de estos segmentos génicos (Roitt y Delves, 2003).

Cada locus del TCR en línea germinal se dispone de una forma muy parecida a los loci de Ig, con un grupo 5' de varios segmentos génicos V seguidos de segmentos D (solo en los loci β y δ) y seguidos a su vez de un grupo de segmentos J, todos en sentido 5' a los genes de la región C (Abbas *et al.*, 2015).

La organización en línea germinal de los loci de la Ig y del TCR existe en todos los tipos de células del cuerpo. Los genes en línea germinal no pueden transcribirse en ARNm que codifiquen receptores para el antígeno funcionales. Los genes del receptor funcional para el antígeno se crean solo en los linfocitos B y T después del reordenamiento del ADN que pone en continuidad segmentos génicos V, (D) y J escogidos (Abbas *et al.*, 2015).

Algunos linfocitos T de ayuda y citotóxicos transponen y expresan genes α y β para TCR, mientras que otros utilizan genes γ y δ para TCR. El tamaño y la importancia de estas dos poblaciones de linfocitos T varían entre especies (Tizard, 2002).

2.12.2.1 Cadenas alfa y delta (α/δ)

La familia de genes alfa y delta para TCR se distingue en que los genes de la cadena delta están incrustados dentro de los genes de la cadena alfa. La familia de cadenas alfa contiene segmentos génicos V, J y C que se encuentran separados en dos regiones por la cadena de genes delta, mientras que la familia delta contiene segmentos V, D, J y C. Cuando los linfocitos T son muy inmaduros, utilizan cadenas delta para sus receptores; sin embargo, a medida que maduran, conmutan y comienzan a utilizar la cadena alfa, con lo que los segmentos génicos de la cadena experimentan delección en asa (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003).

2.12.2.2 Cadena beta (β)

La familia de genes beta para TCR contiene un gran número de segmentos génicos V_β , los cuales se localizan corriente arriba con respecto a dos grupos casi idénticos de segmentos génicos D-J-C, cada uno con alrededor de seis segmentos J funcionales. Cualesquiera de los segmentos génicos V_β puede unirse con cualesquiera de los grupos de genes D-J-C, y el segmento V_β puede unirse a un segmento D_β o a uno J_β (Tizard, 2002).

2.12.2.3 Cadena gamma (γ)

No existe segmento D_γ , por lo cual los segmentos génicos V_γ se combinan directamente con los J_γ (Tizard, 2002).

2.13 Reconocimiento del antígeno usando el MHC

La mayoría de los linfocitos T reconocen antígenos solo en forma de péptidos mostrados por los MHC presentes en la superficie de las APC. Los linfocitos T CD4⁺ cooperadores reconocen antígenos asociados a MHC clase II, y los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ reconocen antígenos asociados a MHC clase I. El reconocimiento del MHC es también necesario para la maduración de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y esto asegura que todos los linfocitos T maduros se restrinjan al reconocimiento únicamente de moléculas del MHC con antígenos unidos. Las moléculas del MHC pueden ligar y presentar péptidos y no otras estructuras químicas, y este es el motivo por el que la mayoría de los linfocitos T reconocen solo péptidos (Abbas *et al.*, 2015).

2.14 Reconocimiento del antígeno sin el uso del MHC

Pequeñas poblaciones de linfocitos T son capaces de reconocer antígenos no proteínicos sin la participación de moléculas de las clases I o II del MHC. De este modo, estas poblaciones son excepciones a la regla de que los linfocitos T puedan ver solo péptidos asociados al MHC. Las poblaciones mejor definidas entre ellas son los NKT y los linfocitos T $\gamma\delta$ (Abbas *et al.*, 2015). Aparte de las proteínas solubles, las células T $\gamma\delta$ también pueden reconocer antígenos no péptidos. Por ejemplo, las células T V γ 9V δ 2 reconocen fosfoantígenos mediante un método independiente de MHC (Karunakaran, 2014).

2.15 Activación del linfocito

Ante un nuevo contacto con el antígeno, los linfocitos T proliferan, desencadenándose 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 (Dionisio *et al.*, 2014). Las diferencias entre las células T y las células B inmunocompetentes están muy demarcadas en la superficie celular (Roitt y Delves, 2003).

La afinidad de un TCR individual por su complejo MHC-péptido antigénico específico es relativamente baja; solo puede lograrse una asociación suficientemente estable con la célula presentadora de antígeno mediante la interacción de pares complementarios de moléculas accesorias (Roitt y Delves, 2003).

2.16 Linfocitos T gamma-delta (T $\gamma\delta$)

Una característica desconcertante de los linfocitos T $\gamma\delta$ es su abundancia en los tejidos epiteliales de ciertas especies (Abbas *et al.*, 2015). Al parecer, la función de los linfocitos T $\gamma\delta$ difiere en gran medida entre las especies de mamíferos. En los artiodáctilos, las células T $\gamma\delta$ constituyen una proporción mucho mayor del total de linfocitos T. Además, los linfocitos T de los rumiantes presentan diversidad de los receptores considerablemente mayor (Tizard, 2002).

Los linfocitos T $\gamma\delta$ reconocen muchos tipos diferentes de antígenos, incluidos algunas proteínas y lípidos. Estos antígenos no se muestran en moléculas del MHC y los linfocitos T $\gamma\delta$ no están restringidos por el MHC, es decir, pueden reconocer antígenos directamente sin un requerimiento para el procesamiento del antígeno. No se sabe si es necesario un tipo celular o un sistema de muestra particular para la presentación de los antígenos a estas células (Tizard, 2002; Roitt y Delves, 2003; Abbas *et al.*, 2015).

Dadas las diferencias marcadas entre los subgrupos de células T $\gamma\delta$ en términos de distribución tisular, diversidad de TCR y antígenos reconocidos, las células T $\gamma\delta$ no pueden ser consideradas como una población linfoide homogénea que cumple una única función especializada. Un notable y único contraste de las células T $\gamma\delta$ es la expresión preferencial de diferentes dominios variables de las cadenas de TCR en diferentes ubicaciones de tejido, sugiriendo así el reconocimiento de un grupo restringido de antígenos relacionados en una parte del cuerpo, que diferiría entre un tejido y otro (Gertner *et al.*, 2007; Karunakaran, 2014).

Las células que sufrieron estrés o daño parecen ser poderosas activadoras de las células T $\gamma\delta$ y hay evidencias de que ciertas moléculas, como las proteínas del choque térmico, actúan como estimuladoras de las células T $\gamma\delta$. Dado que se ha observado que algunas de las células T $\gamma\delta$ clonadas tienen especificidad para las proteínas del shock térmico, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y por lo general son muy inmunógenas, se ha postulado que actúan como una primera línea de defensa relativamente primitiva en las superficies externas del organismo (Roitt y Delves, 2003).

Una subpoblación particular de células T $\gamma\delta$, que posee un espectro diverso de TCR que utiliza segmentos génicos D y J diferentes pero que siempre utiliza los mismos segmentos génicos V, V γ 2 y V δ 2, se expande in vivo para abarcar una gran porción (8 – 60%) de las células T de sangre periférica durante una amplia variedad de infecciones. Estas células reconocen un grupo de antígenos, las alquilaminas, que poseen propiedades químicas y biológicas distintas de los

antígenos lipídicos y de los que contienen fosfato, lo que amplía aún más la variedad de antígenos no proteicos que pueden ser reconocidos por las células T (Roitt y Delves, 2003).

En seres humanos y ratones, los linfocitos $T\gamma\delta$ emigran del timo para colonizar piel, glándulas mamarias, órganos reproductivos y pared intestinal, donde forman una población importante de células T (Tizard, 2002). Las células $T\gamma\delta$, que fortuitamente fueron descubiertas en humanos y roedores son producidas por todos los vertebrados estudiados hasta ahora. Mientras generalmente representan una pequeña fracción de células T en los órganos linfoides, abundan en tejidos mucosos (Gertner *et al.*, 2007).

Los linfocitos $T\gamma\delta$ en el rumiante constituyen hasta un 60% de la población de linfocitos T y se adhieren a una amplia variedad de antígenos, lo que sugiere que su importancia funcional es grande. En ovejas, el epitelio intestinal y la lámina propia también contienen gran cantidad de linfocitos $T\gamma\delta$, que se encuentran asimismo en el epitelio de lengua, esófago, tráquea y vejiga (Tizard, 2002).

Se ha propuesto que la razón por la cual los animales domésticos grandes poseen tantos linfocitos $T\gamma\delta$ cuando son jóvenes es que dichos linfocitos son necesarios para una inmunorreacción celular temprana en animales cuyas inmunoglobulinas no atraviesan la placenta (Tizard, 2002). Un ejemplo de ello son las células T $V\gamma9V\delta2$, que juegan un rol importante en la provisión de la primera línea de defensa contra agentes infecciosos al igual que un rol esencial en la vigilancia inmune y del estrés (Karunakaran, 2014).

2.16.1 Linfocitos T $V\gamma9V\delta2$

Las células T $V\gamma9V\delta2$ son el mayor subgrupo de células $T\gamma\delta$ y comprenden el 1 – 5% de las células T sanguíneas. Los genes $V\gamma9$, $V\delta2$ y $BTN3$ están dispersos entre las especies de mamíferos y no están restringidos solo a los primates, pero curiosamente los 3 genes están altamente conservados entre especies que se distinguen filogenéticamente. La alpaca es una de las 6 especies no primates en las cuales se encontró los genes funcionales $V\gamma9$, $V\delta2$ y $BTN3$ (Karunakaran, 2014).

Desde los linfocitos periféricos de alpaca, se ha identificado la transcripción de la cadena $V\gamma9$, con un reordenamiento JP característico, y la transcripción de cadenas $V\delta2$ con un CDR3 típico de TCR reactivo a fosfoantígenos. También se confirmó que las cadenas de TCR $V\gamma9$ y $V\delta2$ de alpaca se aparean para formar un TCR funcional (Karunakaran, 2014).

Las células T V γ 9V δ 2 son el mayor subtipo de células T $\gamma\delta$ humanas y su TCR está formado por el pareo de una cadena γ que contenga V γ 9 y una cadena δ que contenga V δ 2. La población de células T V γ 9V δ 2 conforman entre el 50% y más del 95% de las células T $\gamma\delta$ en sangre. Curiosamente, dos especies distintas, humano y alpaca, exhibieron compatibilidad entre sus cadenas de TCR (Karunakaran, 2014).

2.17 Linfocitos intraepiteliales

El epitelio de barrera contiene ciertos tipos de linfocitos, como los linfocitos T intraepiteliales, que reconocen y responden a microbios frecuentes. Los linfocitos T intraepiteliales están en la epidermis y en el epitelio mucoso. Pueden considerarse células efectoras de la inmunidad innata e intervienen en la defensa del anfitrión secretando citocinas, activando fagocitos y matando células infectadas (Abbas *et al.*, 2015).

Hay varios subgrupos de linfocitos intraepiteliales presentes en diferentes proporciones, dependiendo de las especies y de la localización tisular. Estos subgrupos se distinguen sobre todo por el tipo de TCR que expresan. Algunos linfocitos T intraepiteliales expresan la forma $\alpha\beta$ tradicional de TCR, que está presente en la mayoría de los linfocitos T en los tejidos linfáticos y en la sangre. Otros linfocitos T del epitelio expresan TCR $\gamma\delta$, que puede reconocer antígenos peptídicos y no peptídicos (Abbas *et al.*, 2015). Los linfocitos intraepiteliales intestinales son en su mayoría células T (Roitt y Delves, 2003). Los linfocitos T hallados bajo las células epiteliales y entre ellas (linfocitos intraepiteliales o IEL) son principalmente TCR $\gamma\delta$. Una proporción de estas células son CD8⁺ (Tizard, 2002).

Los linfocitos intraepiteliales $\gamma\delta$ tienen el potencial para matar una gran variedad de objetivos usando diversos mecanismos. Pueden expresar varios mediadores citotóxicos, uno de ellos es el LAG-3, que se ha reportado que interactúa con los MHC II. Esto sugiere que los macrófagos, linfocitos B y células epiteliales podrían interactuar con los linfocitos intraepiteliales $\gamma\delta$ (Fahrer *et al.*, 2001).

En el epitelio intestinal, el material extraño, que incluye las bacterias, es captado por las células M y pasado a las células presentadoras de antígeno subyacentes, las cuales, a su vez, migran hasta el tejido linfoide local para activar los linfocitos apropiados (Roitt y Delves, 2003). Existe

considerable interacción entre las células epiteliales y los linfocitos $T\gamma\delta$. Así, las primeras producen IL-7 y estimulan a las segundas a proliferar (Tizard, 2002).

Los linfocitos $T\gamma\delta$ reaccionan a dos moléculas MHC clase Ib, MICA y MICB, ambas producidas por células epiteliales estresadas. Los linfocitos $T\gamma\delta$ matan estas últimas células y tal vez su función sea eliminar de manera selectiva las células epiteliales infectadas o dañadas. Las células epiteliales secretan factor de células madre e IL-7, de modo que es posible que también tengan la función de mantener vivos a los linfocitos $T\gamma\delta$. Si la pared intestinal resulta dañada, las células $T\gamma\delta$ secretan citocinas para atraer células $T\alpha\beta$ a la zona (Tizard, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la expresión de los genes gamma y delta del TCR en la mucosa del yeyuno de las crías de alpacas y detectar si su expresión varía según la edad, se optó por conseguir crías de alpacas criadas en forma extensiva en pastos naturales de la región sur del Perú. El número de animales obtenidos para el estudio fue la cantidad de animales aportada por los criadores como aporte voluntario, la cual fue de dieciséis (16) crías de alpaca. Para el estudio, se formó cuatro (4) grupos distintos, de cuatro (4) animales cada uno, sin la opción de que un animal pertenezca a más de un grupo. La formación de los grupos fue según la edad de los animales, para posteriormente comparar los datos entre un grupo y otro. Los animales se agruparon de la siguiente manera:

Calibradores: Recién nacidos que no consumieron calostro

Grupo etario 1: Crías de alpaca de 1 a 7 días de edad

Grupo etario 2: Crías de alpaca de 8 a 14 días de edad

Grupo etario 3: Crías de alpaca de 15 a 21 días de edad

Grupo etario 4: Crías de alpaca de más de 21 días de edad

Los calibradores fueron dos (2) animales que actuaron como puntos de referencia basales en este estudio. El número de animales utilizados para el estudio fue de 16 crías de un total de 100 crías nacidas en la campaña de parición.

La evaluación de la expresión de los genes codificadores de los polipéptidos que conforman el TCR presente en los linfocitos $T\gamma\delta$ mediante el uso del RT-PCR a tiempo real y las posteriores pruebas estadísticas empleadas nos mostraron indirectamente la cantidad de linfocitos $T\gamma\delta$ que se ubican en la mucosa yeyunal.

3.1 Animales

Se utilizó 16 crías de alpacas, clínicamente sanas, de 2 a 47 días de edad, de variedad Suri y Huacaya, de ambos sexos, provenientes del departamento de Cusco, provincia de Canchis, distrito de Marangani. Los animales se criaron en forma extensiva en pastos naturales sin vacunaciones.

3.2 Obtención y almacenamiento de muestras

Se tomó un segmento de 4 cm de longitud del yeyuno de los animales inmediatamente después de su sacrificio y se lavaron con suero fisiológico estéril al 0.9% para retirar el contenido intestinal. Posteriormente, se tomó una sección de 2 cm de largo y se conservó en nitrógeno líquido a -196°C hasta su procesamiento.

3.3 Expresión de TCR $\gamma\delta$

3.3.1 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.

Se inició el procesamiento de las muestras de segmentos intestinales mediante el descongelamiento gradual desde -196°C seguido de -70°C , -20°C y 4°C . Luego, se cortó y pesó 150mg del tejido intestinal y se molió a 4°C con pilón y mortero estériles y congelados para evitar que la muestra se descongele. El molido se realizó hasta pulverizar la muestra. Se agregó 2ml de Trizol® Reagent y se homogenizó para después colocar el material en un vial estéril e incubarlo por 5 minutos. Se transfirió 1ml de la mezcla a un vial y se le agregó 200ul de cloroformo para luego agitar e incubar 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 después agregar 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. Terminado ello, se descartó el tubo de colección con el fluido contenido en él. Posteriormente, el cartucho con la membrana de sílica fue reinsertado en un nuevo tubo de colección. Se realizó este proceso nuevamente.

Se agregó 330ul de buffer de lavado I (proveído por el kit) y se centrifugó a 12000g por 15 segundos. Terminado ello, se descartó el tubo de colección con el fluido contenido en él. Posteriormente, el cartucho con la membrana de sílica fue reinsertado en un nuevo tubo de colección. Se agregó 80ul del Mix ADNasa I (proveído por el kit) sobre la membrana de sílica y

se incubo por 15 minutos. Se agregó 330ul de buffer de lavado I (proveído por el kit) y se centrifugó a 12000g por 15 segundos. Terminado ello, se descartó el tubo de colección con el fluido contenido en él. Posteriormente, el cartucho con la membrana de sílica fue reinsertado en un nuevo tubo de colección. Se repitió este paso nuevamente.

Se adicionó 500ul del buffer de lavado II (proveído por el kit) y se centrifugó a 12000g por 15 segundos. Terminado ello, se descartó el tubo de colección con el fluido contenido en él. Posteriormente, el cartucho con la membrana de sílica fue reinsertado 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. Luego, 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.

3.3.2 Síntesis de ADNc (Transcripción reversa)

El ARN total extraído sirvió de base 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 (ARN) 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 minutos, 50°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos 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 minutos para destruir la molécula de ARN del híbrido ARN:ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70°C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real.

3.3.3 PCR Tiempo real

El ADNc obtenido en el paso anterior fue tomado como templado para la reacción de PCR en tiempo real. Ésta se realizó en el termociclador Applied Biosystems® 7500 empleando el kit comercial “SYBR® GreenERTM qPCR SuperMix Universal” siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción utilizó la polimerasa Hot Start Taq, el agente intercalante “Sybr Green I” como fluoróforo intercalante de cadenas dobles de ADN (que permitió la evaluación de la amplificación “ciclo por ciclo”) y el colorante Rox (que actuó como referencia pasiva). Estos elementos fueron proveídos por el kit.

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 diluido (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 se colocaron en el termociclador y éste 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 fue desde 65°C hasta 90°C, con incrementos de temperatura de 0.3°C cada 30 segundos. Se finalizó 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 y se obtuvo los valores de ciclo umbral (Ct) y el valor de temperatura de disociación (Tm) de cada uno de los productos. Se hizo tres repeticiones por cada muestra para obtener los promedios de Ct y Tm de cada muestra.

Se empleó los cebadores diseñados para este estudio por el programa Primer3Plus teniendo como secuencias el GenBank: JN172913.1 KF734 del gen gamma del TCR de *Camelus dromedarius* y el GenBank: KF734083.1 del gen delta del TCR de *Vicugna pacos*.

TCR γ FW: GCACCTGAGAGCTGCAGAG

TCR γ RV: AGCCTTACCTCCTCCTGGTC

TCR δ FW: GTCTGTTGCCACACCATCTG

TCR δ RV: TCTTCATACTGACCGAGCTTGA

3.3.4 Análisis del RT-PCR tiempo real

El RT-PCR a tiempo real hace uso del Sybr Green, una tinción fluorescente que emite fluorescencia cuando se une a pequeños fragmentos de ADN y luego es activado por una fuente de luz. Por ese motivo, cabe mencionar que la fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN presente en el pocillo analizado. Al analizar los datos del RT-PCR, es necesario establecer un valor umbral, el cual es un valor de fluorescencia que coincide con la fase exponencial de las curvas de amplificación de las muestras. Cuando la computadora detecta que una muestra alcanza el valor umbral, anota en qué ciclo del PCR ocurre dicho alcance. Ese valor anotado es el ciclo umbral (Ct). Al finalizar el RT-PCR, la computadora entrega como resultados los Cts de las muestras analizadas (Applied Biosystems, 2008).

3.3.5 Análisis de la temperatura de disociación

Cuando el ADN de doble cadena unido al SYBR Green es enfrentado a aumentos de temperatura, se detecta una súbita disminución de la fluorescencia cuando la temperatura de disociación es alcanzada debido a la separación de las cadenas ADN y la posterior liberación del SYBR Green. El análisis de la curva de temperatura de disociación nos asegura la especificidad del PCR: diferentes productos del PCR presentan temperaturas de disociación diferentes (Life Technologies Corporation, 2012).

3.3.6 Cuantificación relativa de cadenas de TCR γ y δ

Los métodos para la cuantificación relativa de la expresión de genes permiten cuantificar diferencias en el nivel de expresión de un gen específico entre distintas muestras. Para obtener una cuantificación relativa certera de un ARNm, se recomienda evaluar también el nivel de expresión de un gen control endógeno. Usando un control endógeno como referencia activa, puedes normalizar la cuantificación de los genes objetivos (Applied Biosystems, 2008).

Cualquier gen que haya demostrado que se expresa en todas las muestras y presenta muy poca variación entre las muestras podría ser usado como un control endógeno. Ese es el caso del gen GAPDH (Applied Biosystems, 2008).

La cuantificación relativa de la transcripción reversa de los genes del TCR, gamma (γ) y delta (δ), se realizó con el método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) o también llamado método Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Rebrikov y Trofimov, 2006). Este método utiliza fórmulas aritméticas para alcanzar los resultados de la cuantificación relativa (Applied Biosystems, 2008).

Livak y Schmittgen (2001) explicaron la fórmula del método $\Delta\Delta Ct$ de la siguiente manera:

La amplificación exponencial del PCR es:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Donde X_n es el número de moléculas del gen objetivo en el ciclo “n” del PCR, X_0 es el número inicial de moléculas del gen objetivo, E_x es la eficiencia de amplificación del gen objetivo y “n” es el número de ciclos del PCR transcurridos hasta el momento del cálculo.

Aplicando la fórmula anterior en el Ct del gen objetivo de una muestra, se obtendría el número de moléculas que obtuvo la muestra al momento de alcanzar el valor umbral de fluorescencia (cabe mencionar que si todas las muestras alcanzan el mismo valor umbral de fluorescencia, se puede concluir que todas las muestras alcanzan el mismo número de moléculas transcritas del gen objetivo pero cada muestra lo alcanza en un ciclo del PCR distinto). Así:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{Ct,x} = K_x$$

Donde X_T es el número de moléculas de gen objetivo al momento del Ct; y “Ct,x” es el Ct del gen objetivo de la muestra analizada. Todas las muestras alcanzan el mismo número de moléculas al momento del Ct, por lo cual X_T es una constante ($X_T = K_x$).

El mismo fundamento se aplica al analizar el gen control endógeno, por lo cual:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{Ct,R} = K_R$$

Donde R_T es el número de moléculas de gen control endógeno al momento del Ct , R_0 es el número inicial de moléculas del gen control endógeno, E_R es la eficiencia de amplificación del gen control endógeno y “ Ct,R ” es el Ct del gen control endógeno de la muestra analizada. Todas las muestras alcanzan el mismo número de moléculas de gen control endógeno al momento del Ct , por lo tanto R_T es una constante ($R_T = K_R$).

Dividiendo X_T por R_T se obtiene otro valor constante para todas las muestras:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{Ct,X}}{R_0 \times (1 + E_R)^{Ct,R}} = \frac{K_x}{K_R} = K$$

Asumiendo que las eficiencias de amplificación del gen objetivo y el gen control endógeno son equivalentes:

$$E_x = E_R$$

$$K = \frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{Ct,X - Ct,R}$$

$$K = X_N \times (1 + E)^{\Delta Ct}$$

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta Ct}$$

Donde $X_N = X_0 / R_0$

El mismo cálculo se puede realizar con los valores del animal calibrador. Al dividir el X_N de cualquier muestra con el X_N del animal calibrador, se obtiene:

$$\frac{X_{N,mue}}{X_{N,cal}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta Ct,mue}}{K \times (1 + E)^{-\Delta Ct,cal}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta Ct}$$

Donde $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{calibrador}$

En muchos casos, el valor de la eficiencia de amplificación es cercano a 1. Es por ello que para facilitar los cálculos, se considera el valor de la eficiencia como 1 y la fórmula final se presenta como:

$$(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó los resultados obtenidos de la cuantificación relativa de la transcripción reversa de los genes del TCR, gamma (γ) y delta (δ), por separado, mediante el método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Rebrikov y Trofimov, 2006) (Cuadros 1 y 3).

Primero, había que analizar si los datos que íbamos a evaluar presentaban una distribución normal. La prueba de Shapiro-Wilk es una prueba que nos permite saber si los datos presentan o no una distribución normal (Martínez-González *et al.*, 2006). Los resultados indicaron que, tanto en el gen gamma como en el delta, las muestras no presentaban una distribución normal (Figuras A.3 y A.8).

Para detectar si existía diferencias estadísticas entre los grupos etarios de este estudio, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Es un método no paramétrico que permite comparar, con una sola prueba, las medianas de un conjunto de muestras independientes (o grupos independientes) (Martínez-González *et al.*, 2006). Los resultados de esta prueba detectaron diferencia estadística entre algunos de los grupos, tanto en el gen gamma como en el delta (Figuras A.4 y A.9).

Por último, para saber entre qué grupos existía diferencia estadística, se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras, la cual requiere 2 muestras independientes cuya variable a analizar sea cuantitativa continua y siga una distribución no normal o discreta. Si la hipótesis nula se rechaza, se concluye que las muestras provienen de poblaciones con diferente forma funcional o distribución (González y Falcón, 1999; Steel y Torrie, 1988) (Cuadros 2 y 4, Figuras A.5 y Figuras A.10).

Los datos se procesaron mediante el uso del paquete estadístico STATA versión 14.0, y se estableció la significación estadística en 5%.

IV. RESULTADOS

4.1 GAPDH

4.1.1 Expresión de GAPDH

Se realizó el RT-PCR en tiempo real de todas las muestras empleando cebadores específicos para el gen constitutivo GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), el cual fue usado como control endógeno. El 100% de las muestras (16/16) transcribió el gen GAPDH hasta alcanzar y superar un valor umbral. Las muestras alcanzaron el valor umbral antes de los 40 ciclos de amplificación. El ciclo en el cual una muestra alcanza el valor umbral de transcripción se le llama ciclo umbral (Ct). Los valores de estos Cts variaron dentro de un rango de 16.72 a 19.64 (Cuadro A.1), evidenciando la integridad del tejido expresando constitutivamente este gen.

4.2 GEN GAMMA (γ)

4.2.1 Expresión del gen gamma

De los resultados del RT-PCR tiempo real usando el set de cebadores específicos para el gen gamma, se consideraron positivas aquellas muestras con una curva de amplificación clara, sin ruido de fondo que represente productos inespecíficos. Los valores de ciclo umbral (Ct) que alcanzaron las muestras se encontraron en un rango entre 27.98 y 32.57, indicando que todas las muestras expresan el gen gamma en distintas cantidades (Figura A.1).

La derivada de la curva de disociación permite comprobar si se transcribió el mismo producto en todas las muestras bajo la premisa: “similares secuencias de nucleótidos deben romper sus enlaces a similares temperaturas”. El análisis de la derivada de la curva de disociación mostró un producto mayor expresado por los 16 animales, cuyos valores de temperatura de disociación (Tm) se encontraban entre 87.83 y 88.28 °C. A su vez, la curva mostró un producto menor presentado por 10 de los animales (62.5%), cuyos valores de Tm se encontraban entre 81.57 y 82.32 °C (Figura A.2; Cuadro A.2).

4.2.2 Cuantificación relativa del gen gamma

Empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y tomando como punto de comparación los niveles de expresión de las crías neonatas que no consumieron calostro (calibradores), se demostró que los niveles de expresión del gen gamma (γ) incrementaron con el aumento de edad, elevándose también la variabilidad de expresión del gen entre los animales muestreados de más de 3 semanas de edad (Cuadro 1; Figura 4). Los animales con 2 semanas de diferencia de edad muestran diferencias estadísticas en la expresión del gen gamma; es decir, existe diferencia en la expresión del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 3, y 2 y 4. Además de ello, existe diferencia estadística entre los grupos etarios 3 y 4 (Figuras A.5).

Cuadro 1. Cuantificación relativa del gen gamma del TCR de crías de alpacas.

	Muestra	Edad (días)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ por grupo etario
	Calibrador 1	Neonato	0,67	1,08±0.6*
	Calibrador 2	Neonato	1,49	
Grupo etario 1	Animal 1	2 días	5,83	4,75±1.6*
	Animal 2	3 días	4,86	
	Animal 3	5 días	2,46	
	Animal 4	2 días	5,83	
Grupo etario 2	Animal 5	8 días	4,34	6,78±2.2*
	Animal 6	8 días	6,44	
	Animal 7	10 días	6,78	
	Animal 8	13 días	9,57	
Grupo etario 3	Animal 9	19 días	9,30	16,24±6.4*
	Animal 10	20 días	21,70	
	Animal 11	21 días	12,24	
	Animal 12	20 días	21,70	
Grupo etario 4	Animal 13	38 días	103,29	103,11±92.5*
	Animal 14	47 días	30,48	
	Animal 15	41 días	45,04	
	Animal 16	47 días	233,65	

* Valor de la desviación estándar

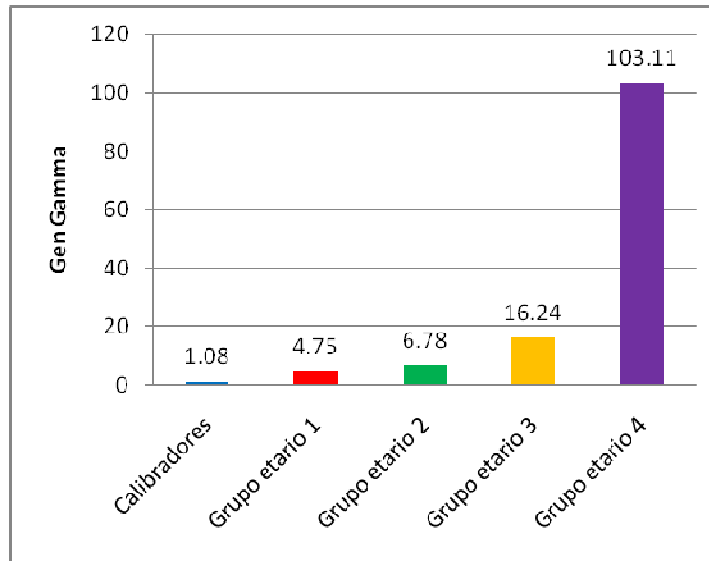


Figura 4. Promedios de los valores de cuantificación relativa de los genes de Gamma del TCR de crías de alpacas según los grupos etarios. Se puede observar que los grupos etarios tienen valores promedio diferentes.

4.2.3 Análisis estadístico complementario del gen gamma

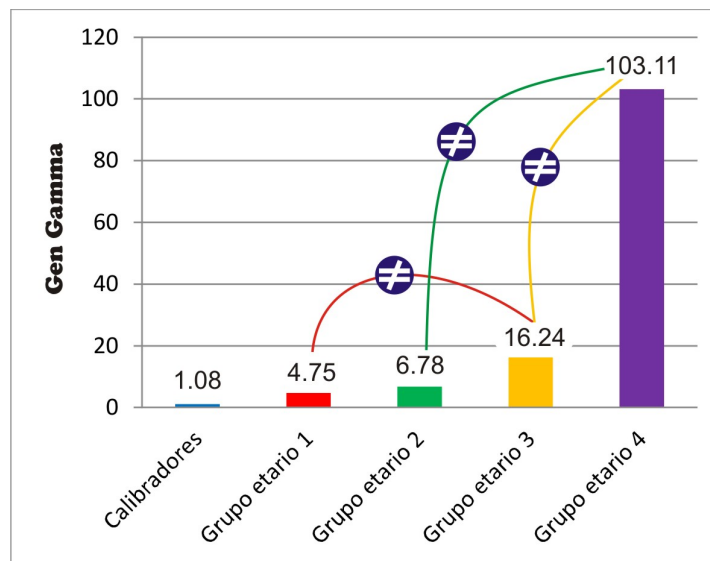
Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los valores de expresión del gen gamma presentaban una distribución normal. El resultado indicó que dichos valores no presentaban una distribución normal (Figura A.3).

Para detectar si existía diferencia significativa entre grupos etarios, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados indicaron que existía diferencia significativa entre algunos de los grupos ($P \leq 0.05$) (Figura A.4).

Para determinar entre qué grupos existía diferencia estadística significativa, se empleó múltiples veces la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras. Los resultados se presentan resumidos en el Cuadro 2 y la Figura 5.

Cuadro 2. Resultados del análisis de la expresión relativa del gen gamma del TCR con la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras ($P < 0.05$).

Grupos etarios comparados	Prob> [z]	Diferencia significativa
Grupo 1 y Grupo 2	0.229	No
Grupo 1 y Grupo 3	0.029	Sí
Grupo 1 y Grupo 4	0.029	Sí
Grupo 2 y Grupo 3	0.229	No
Grupo 2 y Grupo 4	0.029	Sí
Grupo 3 y Grupo 4	0.029	Sí



≠ : diferencia estadística

Figura 5. Diferencias estadísticas de los valores del gen gamma entre grupos etarios. La figura representa la existencia de diferencia estadística entre los grupos etarios 1 y 3, 2 y 4, y 3 y 4 ($P \leq 0.05$).

4.3 Gen Delta (δ)

4.3.1 Expresión del gen delta

De los resultados del RT-PCR tiempo real usando el set de cebadores específicos para el gen delta, se consideraron positivas aquellas muestras con una curva de amplificación clara, sin ruido de fondo que represente productos inespecíficos. Los valores de ciclo umbral (Ct) que alcanzaron las muestras se encontraron en un rango entre 18.04 y 21.98, indicando que todas las muestras expresan el gen delta en distintas cantidades (Figura A.6). La derivada de la curva de disociación permite comprobar si se transcribió el mismo producto en todas las muestras bajo la premisa: “similares secuencias de nucleótidos deben romper sus enlaces a similares temperaturas”. El análisis de la derivada de la curva de disociación mostró un producto único expresado por cada animal, cuyos valores de temperatura de disociación (T_m) se encontraban entre 77.55 y 77.99 °C (Figura A.7; Cuadro A.3.).

4.3.2 Cuantificación relativa del gen delta

Empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y tomando como punto de comparación los niveles de expresión de las crías neonatas que no consumieron calostro (calibradores), se demostró que los niveles de expresión del gen delta (δ) incrementaron con el aumento de edad, elevándose también la variabilidad de expresión del gen entre los animales muestreados de más de 3 semanas de edad (Cuadro 3; Figura 6). Existe diferencia estadística en la expresión del gen delta al comparar el grupo etario 4 con cualquiera de los otros grupos etarios (Figuras A.10).

Cuadro 3. Cuantificación relativa del gen delta del TCR de crías de alpacas.

	Muestra	Edad (días)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ por grupo etario
	Calibrador 1	Neonato	0,76	1,04±0.4*
	Calibrador 2	Neonato	1,31	
Grupo etario 1	Animal 1	2 días	7,32	9,43±2.6*
	Animal 2	3 días	12,8	
	Animal 3	5 días	10,27	
	Animal 4	2 días	7,32	
Grupo etario 2	Animal 5	8 días	17,18	20,78±10.0*
	Animal 6	8 días	22,1	
	Animal 7	10 días	33,8	
	Animal 8	13 días	10,03	
Grupo etario 3	Animal 9	19 días	10,82	25,08±9.8*
	Animal 10	20 días	28,23	
	Animal 11	21 días	33,05	
	Animal 12	20 días	28,23	
Grupo etario 4	Animal 13	38 días	251,32	146,46±115.3*
	Animal 14	39 días	46,23	
	Animal 15	41 días	47,06	
	Animal 16	47 días	241,21	

* Valor de la desviación estándar

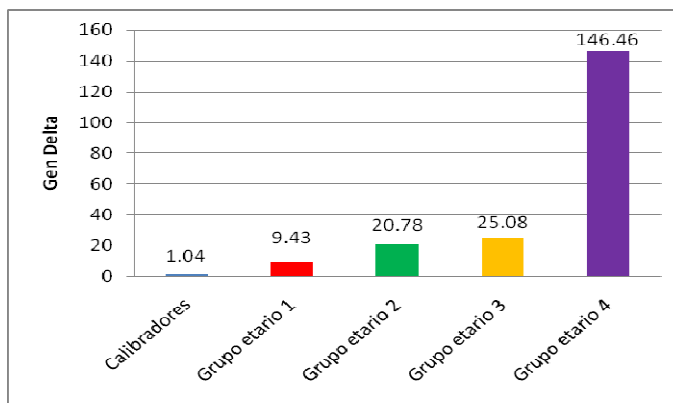


Figura 6. Promedios de los valores de cuantificación relativa de los genes de Delta del TCR de crías de alpacas según los grupos etarios. Se puede observar que los grupos etarios tienen valores promedio diferentes.

4.3.3 Análisis estadístico complementario del gen delta

Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los valores de expresión del gen delta presentaban una distribución normal. El resultado indicó que dichos valores no presentaban una distribución normal (Figura A.8).

Para detectar si existía diferencia significativa entre algunos de los grupos etarios, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados indicaron que existía diferencia estadística entre algunos de los grupos ($P \leq 0.05$) (Figura A.9).

Para determinar si había diferencia estadística significativa entre los grupos etarios, se empleó múltiples veces la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras. Los resultados se presentan resumidos en el Cuadro 4 y Figura 7.

Cuadro 4. Resultados del análisis de la expresión relativa del gen delta del TCR con la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras ($P < 0.05$).

Grupos etarios comparados	Prob> [z]	Diferencia significativa
Grupo1 y Grupo2	0.229	No
Grupo1 y Grupo3	0.229	No
Grupo1 y Grupo4	0.029	Sí
Grupo2 y Grupo3	0.771	No
Grupo2 y Grupo4	0.029	Sí
Grupo3 y Grupo4	0.029	Sí

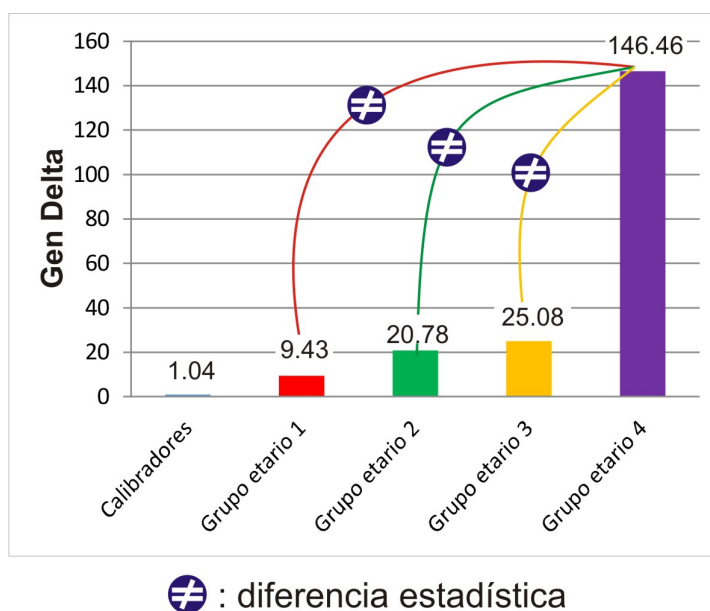


Figura 7. Diferencias estadísticas de los valores del gen delta entre grupos etarios. La figura representa la existencia de diferencia estadística entre los grupos etarios 1 y 4, 2 y 4, y 3 y 4.

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se cuantificó los valores relativos de expresión de ARNm de las cadenas gamma (γ) y delta (δ) en la mucosa yeyunal de crías de alpacas aparentemente sanas utilizando el gen de GAPDH como normalizador o control interno en el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), uno de los genes más usados por su poca variabilidad y su expresión constante en distintos tipos celulares (Walker *et al.*, 2009), y que ha sido utilizado en el análisis de la expresión relativa de péptidos antimicrobianos de la mucosa intestinal de alpacas (More *et al.*, 2011; Siuce *et al.*, 2015).

Los resultados muestran que, tanto los genes del polipéptido gamma como los del delta van incrementando su expresión según aumenta la edad de las crías de alpaca; sin embargo, el gen delta se expresa más que el gamma en todos los grupos etarios. La formación del TCR $\gamma\delta$ se realiza con la unión de estos polipéptidos en el retículo endoplásmico de los linfocitos T junto a las proteínas que conforman el CD3 por acción de la Glucosiltransferasa, realizando las glicosilaciones de las proteínas y formando enlaces disulfuros entre los polipéptidos, similar a lo que ocurre en la formación de los TCR $\alpha\beta$ (Gardner y Kearse, 1999). Sobre las distintas proporciones de expresiones de estos polipéptidos, que no son equivalentes a pesar de que el TCR está formado solo por una cadena gamma y una cadena delta, podría deberse a los mecanismos por los cuales dichas cadenas se unen en el retículo endoplásmico a otras proteínas necesarias para su expresión, como son las proteínas CD3, en donde existe proteínas que se expresan y forman parte del complejo TCR-CD3 y otras que solo participan en los mecanismos de enlaces proteicos pero no son parte del complejo, como la proteína CD3 Omega (Neisig *et al.*, 1993). Por otro lado, observando los valores del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de ambos genes, parecería que el gen gamma se expresa menos que el gen delta, pero eso puede ser porque en el caso del gen gamma solo se está cuantificando el producto de mayor peso molecular. Los cebadores utilizados fueron de camello. Si se hubiera usado cebadores específicos de camélido sudamericano, quizás se hubiera conseguido valores del gen gamma más cercanos a los del gen delta.

Sobre el gen gamma, se evidenció dos productos del PCR teniendo como molde inicial a los ARN mensajeros del gen de la cadena gamma del TCR. Cada animal que presentó dos productos mostró doble temperatura de disociación (T_m): mientras todos los animales evaluados tuvieron el producto de un mayor T_m (88.12°C), un 62.5% de crías mostraron un producto de menor T_m (82°C), indicando que el gen al ser traducido expresa distintos ARN mensajeros, esto debido a que estas poliproteínas tienen una región variable que detecta a los

distintos antígenos (Couedel *et al.*, 2004) que en este caso afectan a las alpacas. La selección negativa que ocurre en el timo (Strominger, 1989) debe también seleccionar algunos linfocitos que tienen variaciones a nivel de la expresión de regiones menos variables que pueden originar estos dos tipos de productos en el PCR. Las temperaturas de disociación entre un producto y el otro tuvieron alta diferencia, evidenciando que existe gran variabilidad entre ellos. Al analizar mediante el programa Blast al gen gamma y sus respectivos cebadores utilizados en este trabajo, se evidenció que el cebador “forward” se complementa con una secuencia que inducía la transcripción de un mismo gen a partir de 2 puntos (nucleótidos) distintos (dato no mostrado), lo que indicaría el motivo por lo cual se obtuvo 2 productos provenientes de una misma secuencia génica.

Los productos de la cadena delta mostraron temperaturas de disociación (T_m) similares entre una muestra y otra, demostrando así que se amplificó el mismo producto. Se demostró la efectividad del uso del gen de GAPDH como gen calibrador ya que se detectó en el 100% de las crías en un nivel constante como se ha determinado en otras especies animales (Kozera y Rapacz, 2013).

Observando los valores obtenidos con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sobre el gen gamma, se vio que la expresión de este gen fue aumentando semana tras semana siendo estadísticamente significativa a partir de la cuarta semana. Esta tendencia al incremento de la expresión de este gen es debido a la expansión clonal que debe estar ocurriendo en el tejido linfoide asociado en la mucosa intestinal al estar siendo colonizada por la flora microbiana intestinal, ya que estos linfocitos $T\gamma\delta$ son altamente activos en este lugar para reconocer a los antígenos y actuar como una célula presentadora de antígeno profesional (Brandes *et al.*, 2005). La unión de los diversos antígenos producidos en el intestino en continua colonización de la flora microbiana induce a los linfocitos $TCR\gamma\delta$ intraepiteliales a activar una respuesta tanto celular como humoral, como se ha observado en el incremento de producción de IgA en la mucosa intestinal de las crías de alpacas clínicamente sanas (Dionisio *et al.*, 2014). Podemos concluir que, a partir de la tercera semana de edad, la expresión del gen gamma aumenta considerablemente semana tras semana. Con respecto al gen delta en el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, la expresión del gen fue aumentando semana tras semana; sin embargo, mediante el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras, se detectó que la expresión que se obtuvo después de la tercera semana de edad fue significativamente mayor que la de la tercera semana. Además, sí se detectó un aumento significativo entre la segunda y la cuarta semana de edad.

Podemos concluir que la expresión del gen delta aumenta semana tras semana a partir de la tercera semana de edad.

VI. CONCLUSIÓN

La expresión relativa de los genes gamma y delta del receptor de linfocitos T en yeyuno de crías de alpaca aumenta significativamente después de la tercera semana de edad.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2015. Inmunología celular y molecular. 8a ed. Elsevier España. Barcelona.
2. Applied Biosystems. 2008. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. [Internet], [10 diciembre 2016]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/search/results?query=Guide%20to%20Performing%20Relative%20Quantitation%20of%20Gene%20Expression%20Using%20Real-Time%20Quantitative%20PCR%201&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=>
3. Brandes M, Willmann K, Moser B. 2005. Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ T Cells. *Science* 309 (5732): 264-268. DOI: 10.1126/science.1110267.
4. Couedel C, Lippert E, Bernardeau K, Bonneville M, Davodeau F. 2004. Allelic exclusion at the TCR δ locus and commitment to δ lineage: different modalities apply to distinct human $\gamma\delta$ subsets 1. *The Journal of Immunology* 172: 5544–5552.
5. Davis W, Heirman L, Hamilton M, Parish S, Barrington G, Loftis A, Rogers M. 2000. Flow cytometric analysis of an immunodeficiency disorder affecting juvenile llamas. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 74: 103-120.
6. Dionisio J, Manchego A, Chiok K, Sandoval N, More J, Pezo D, Rivera H. 2014. Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *RevInvVetPerú* 25 (2): 151-161. ISSN 1609-9117.
7. Fahrner A, Königshofer Y, Kerr E, Ghandour G, Mack D, Davis M, Chien Y. 2001. Attributes of $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 98 (18): 10261-10266.
8. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina TCP/RLA/2914.
9. Fundación Suyana. 2010. Manual de sanidad de alpacas y llamas. [Internet], [6 enero 2016]. Disponible en: http://www.suyana.ch/fileadmin/user_upload/Bolivien/Ausbildung/Lehrmaterial/Manual_de_sanidad_de_alpacas_y_llamas.pdf.
10. Gardner T, Kears K. 1999. Modification of the T cell antigen receptor (TCR) complex by UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (20): 14094–14099.

11. Gertner J, Scotet E, Poupot M, Bonneville M, Fournié J. 2007. Lymphocytes: gamma delta. Encyclopedia of life sciences & 2007, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net. Ubicado en <http://www.roitt.com/els.asp>
12. González A, Falcón N. 1999. Análisis de datos en Medicina Veterinaria. Publicación técnica de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (41): 27-29.
13. Hurtado J. 2011. La enterotoxemia en alpacas: algunos aspectos etiológicos y clínicos. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (Sirivs) [Internet], [6 enero 2016]. Disponible en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_hurtado_enterotoxemia_alpacas.pdf
14. Karunakaran M. 2014. The evolution of V γ 9V δ 2 T cells. Tesis de doctorado en Virología e Inmunobiología. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 93 p.
15. Kozera B, Rapacz M. 2013. Reference genes in real-time PCR. J Appl Genetics 54: 391-406. DOI 10.1007/s13353-013-0173-x
16. Life Technologies Corporation. 2012. Real-time PCR handbook. [Internet], [27 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
17. Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. ElsevierScience 25: 402-408.
18. Mamani J, Condemayta Z, Calle L. 2009. Causas de mortalidad de alpacas en tres principales centros de producción ubicados en puna seca y húmeda del departamento de Puno. RevElectronVet10(8). ISSN 1695-7504.
19. Martínez-González M, Sánchez-Villegas A, Faulín F. 2006. Bioestadística amigable. 2a ed. Ediciones Díaz de Santos. España
20. More J, Manchego A, Sandoval N, Ramírez M, Pezo D, Chiok K, Rivera H. 2011. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (a- y b-defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). RevInvVet Perú 22 (4): 324-335.
21. 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 Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 104 p.
22. Moya E, Torres J. 2008. Familias alpaqueras enfrentando al cambio climático. Soluciones Prácticas-ITDG. Lima.
23. Neisig A, Vangsted A, Zeuthen J, Geisler C. 1993. Assembly of the T-cell antigen receptor. Participation of the CD3 omega chain. JImmunol 15; 151(2): 870-879.

24. Pezo D, Franco E, García W, Franco F, Bravo W, Alarcón V, San Martín F. 2014. Manual del técnico alpaquero. 2ª ed. Soluciones Prácticas. Lima.
25. Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 9.
26. Ramírez M. 2011. La inmunoglobulina A secretoria en la mucosa intestinal de camélidos sudamericanos. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (Sirivs) [Internet], [6 enero 2016]. Disponible en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_mercy_Final.pdf
27. Rebrikov D, Trofimov D. 2006. Real-Time PCR: A review of Approaches to Data Analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (5): 455-463.
28. Roca V, Manchego A, Sandoval N, Chiok K, Rivera H. 2014. Caracterización histológica y dinámica linfóide de las placas de Peyer en crías de alpaca durante los 45 primeros días de vida. *RevInvVet Perú* 25 (3): 341-349. ISSN 1609-9117.
29. Rodríguez J, Vásquez M, Lira B, Lucas J, Barrios M, Morales S, Lopez B. 2015. Cambios en los parámetros fisiológicos por diarrea neonatal en crías de alpaca. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 9 (1): 1-9. ISSN 1988-2688.
30. Roitt I, Delves P. 2003. *Inmunología Fundamentos*. 10a ed. Editorial médica Panamericana. Madrid – España.
31. Rosadio R, Yaya K, Véliz A, Quispe T. 2012. Efecto protector de una vacuna polivalente anticlostridial sobre la mortalidad neonatal en alpacas. *RevInvVet Perú* 23 (3): 299-306.
32. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Luna L, Yaya K, Londoño P. 2012. Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia de las alpacas. *RevInvVet Perú* 23 (3): 251-260.
33. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *RevInvVet Perú* 23 (3): 261-271.
34. Siuce J, Manchego A, Sandoval N, More J, Chiok K, Pezo D, Rivera H. 2015. Expresión de defensinas en yeyuno de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con enteropatías. *RevInvVet Perú* 26 (2):317-327.
35. Steel R, Torrie J. 1988. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2a ed. McGraw-Hill/ Interamericana de México. México. Naucalpan de Juárez.
36. Strominger J. 1989. Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244: 943-950
37. Tizard I. 2002. *Inmunología Veterinaria*. 6a ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. México D.F.
38. Wyatt C, Brackett E, Perryman L, Rice-Ficht A, Brown W, O'Rourke K. 1997. Activation of intestinal intraepithelial T lymphocytes in calves infected with *Cryptosporidium parvum*. *InfectImm* 65 (1): 185-190.

VIII. APÉNDICE

Cuadro A.1. Ct del gen GAPDH de alpacas estudiadas.

	Muestra	Edad (días)	Ct (GAPDH)
	Calibrador 1	Neonato	16,51
	Calibrador 2	Neonato	16,89
Grupo etario 1	Animal 1	2 días	18,09
	Animal 2	3 días	17,66
	Animal 3	5 días	17,65
	Animal 4	2 días	18,09
Grupo etario 2	Animal 5	8 días	17,80
	Animal 6	8 días	17,71
	Animal 7	10 días	18,18
	Animal 8	13 días	17,80
Grupo etario 3	Animal 9	19 días	18,85
	Animal 10	20 días	18,59
	Animal 11	21 días	16,72
	Animal 12	20 días	18,59
Grupo etario 4	Animal 13	38 días	19,45
	Animal 14	39 días	17,86
	Animal 15	41 días	19,10
	Animal 16	47 días	19,64

Figura A.1. Curva de amplificación de los valores del gen gamma del TCR de las 16 crías de alpacas. Se observa la línea de corte. El eje X es el número de ciclo de PCR y el eje Y es el nivel de fluorescencia obtenida después de cada ciclo de amplificación. Cada línea curva de color representa una muestra analizada, existiendo 3 repeticiones por cada muestra (n = 48). El color de la línea representa la fila de la placa de pocillos a la cual pertenece cada muestra. Se observa que las muestras alcanzan el valor umbral entre los 27.98 y 32.57 ciclos del PCR (rango de valores de Cts).

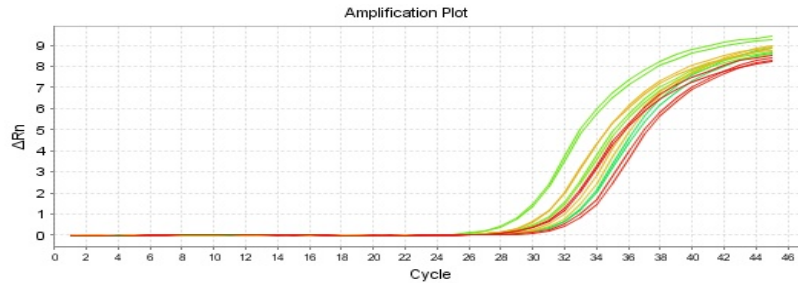
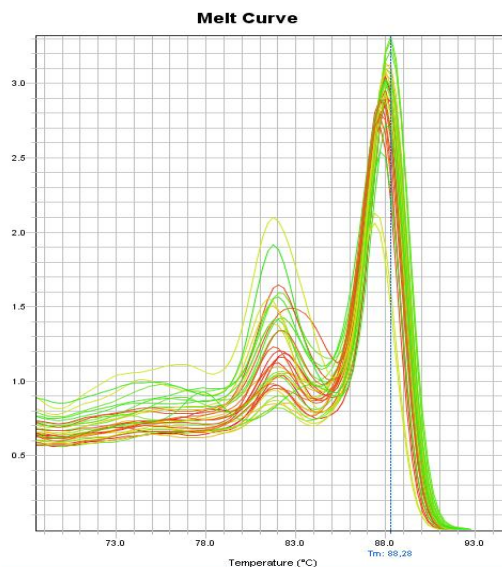


Figura A.2. Derivada de la curva de disociación de los productos del PCR tiempo real del gen gamma del TCR de 16 crías de alpacas. Se muestra la temperatura de disociación (Tm) de los productos. Cada línea curva de color representa una muestra analizada, existiendo 3 repeticiones por cada muestra (n = 48). El color de la línea representa la fila de la placa de pocillos a la cual pertenece cada muestra. Se puede observar que las líneas muestran un patrón similar, teniendo como temperatura pico (temperatura de disociación) valores entre 87.83 y 88.28 °C.



Cuadro A.2. Ct y temperatura de disociación de los valores gamma.

Muestra	Edad (días)	Ct (gamma)	Tm (producto mayor)	Tm (producto menor)	
Calibrador 1	Neonato	33,30	88.2785	82.0163	
Calibrador 2	Neonato	32,52	88.2785	82.3145	
Grupo etario 1	Animal 1	2 días	31,76	88,1294556	81,868103
	Animal 2	3 días	31,59	88,2785339	82,1662598
	Animal 3	5 días	32,57	88,1294556	81,7190247
	Animal 4	2 días	31,76	88,1294556	82,1662598
Grupo etario 2	Animal 5	8 días	31,89	87,9803772	82,1662598
	Animal 6	8 días	31,24	88,1294556	82,3153381
	Animal 7	10 días	31,63	88,1294556	81,868103
	Animal 8	13 días	30,76	88,1294556	-
Grupo etario 3	Animal 9	19 días	31,85	87,8312912	81,5699463
	Animal 10	20 días	30,36	88,1294556	81,868103
	Animal 11	21 días	29,32	87,9803772	-
	Animal 12	20 días	30,36	87,9803772	81,868103
Grupo etario 4	Animal 13	38 días	28,97	88,1294556	-
	Animal 14	47 días	29,22	87,9803772	-
	Animal 15	41 días	29,82	87,9803772	-
	Animal 16	47 días	27,98	88,2785339	-

Figura A.3. Prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los valores de expresión del gen gamma presentan una distribución normal ($P \leq 0.05$).

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
gamma	16	0.54182	9.284	4.426	0.00000

Figura A.4. Prueba de Kruskal-Wallis para detectar si existe diferencia significativa en los valores del gen gamma entre grupos etarios ($P \leq 0.05$).

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

grupo	Obs	Rank Sum
1	4	13.00
2	4	24.00
3	4	41.00
4	4	58.00

chi-squared = 12.860 with 3 d.f.
probability = 0.0049

chi-squared with ties = 12.898 with 3 d.f.
probability = 0.0049

Figura A.5.1. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 2 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\gamma - Kolmogorov Smirnov - 1 y 2.dta", clear
. ksmirnov gamma, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
1:	0.7500	0.105	
2:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	0.7500	0.211	0.229

Figura A.5.2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 3 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\gamma - Kolmogorov Smirnov - 1 y 3.dta", clear
. ksmirnov gamma, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
1:	1.0000	0.018	
3:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029

Figura A.5.3. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 1 y 4 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\gamma - Kolmogorov Smirnov - 1 y 4.dta", clear
. ksmirnov gamma, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
1:	1.0000	0.018	
4:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029

Figura A.5.4. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 2 y 3 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\gamma - Kolmogorov Smirnov - 2 y 3.dta", clear
. ksmirnov gamma, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
2:	0.7500	0.105	
3:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	0.7500	0.211	0.229

Figura A.5.5. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 2 y 4 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\gamma - Kolmogorov Smirnov - 2 y 4.dta", clear
. ksmirnov gamma, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
2:	1.0000	0.018	
4:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029

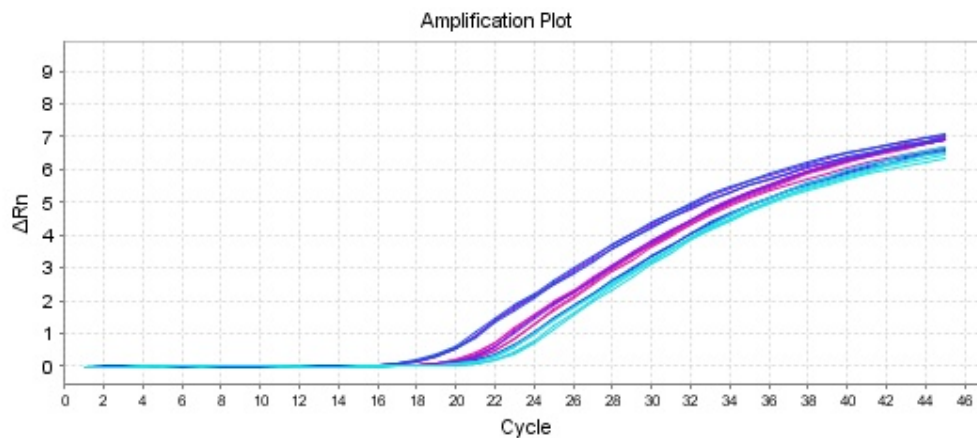
Figura A.5.6. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen gamma entre los grupos etarios 3 y 4 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\gamma - Kolmogorov Smirnov - 3 y 4.dta", clear
. ksmirnov gamma, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
3:	1.0000	0.018	
4:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029

Figura A.6. Curva de amplificación de los valores del gen delta del TCR de las 16 crías de alpacas. Se observa la línea de corte (threshold). El eje X es el número de ciclo de PCR y el eje Y es el nivel de fluorescencia obtenido después de cada ciclo de amplificación. Cada línea curva de color representa una muestra analizada, existiendo 3 repeticiones por cada muestra ($n = 48$). El color de la línea representa la fila de la placa de pocillos a la cual pertenece cada muestra. Se observa que las muestras alcanzan el valor umbral entre los 18.04 y 21.98 ciclos del PCR (rango de valores de Cts).



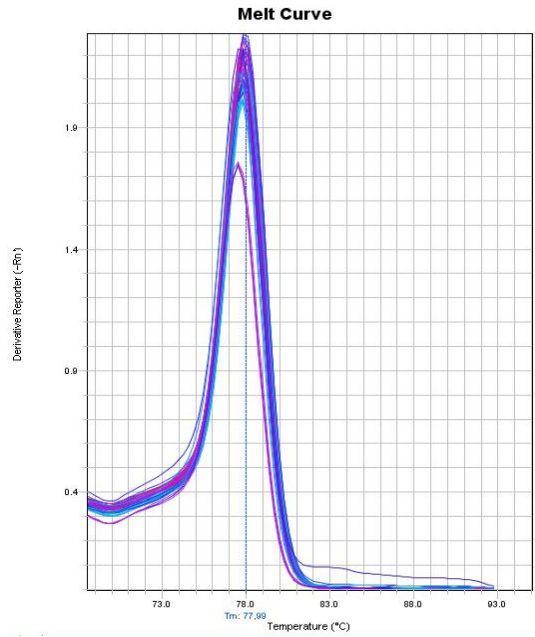


Figura A.7. Derivada de la curva de disociación de los productos del PCR tiempo real del gen delta del TCR de 16 crías de alpacas. Se muestra la temperatura de disociación (T_m) de los productos. Cada línea curva de color representa una muestra analizada, existiendo 3 repeticiones por cada muestra ($n = 48$). El color de la línea representa la fila de la placa de pocillos a la cual pertenece cada muestra. Se puede observar que las líneas muestran un patrón similar, teniendo como temperatura pico (temperatura de disociación) valores entre 77.55 y 77.99 °C.

Cuadro A.3. Ct y temperatura de disociación (Tm) de los valores delta.

	Muestra	Edad (días)	Ct (delta)	Tm
	Calibrador 1	Neonato	23,47	77,8429489
	Calibrador 2	Neonato	23,06	77,5536346
Grupo etario 1	Animal 1	2 días	21,79	77,9920273
	Animal 2	3 días	20,54	77,8429489
	Animal 3	5 días	20,86	77,9920273
	Animal 4	2 días	21,79	77,9920273
Grupo etario 2	Animal 5	8 días	20,26	77,8429489
	Animal 6	8 días	19,81	77,8429489
	Animal 7	10 días	19,66	77,9920273
	Animal 8	13 días	21,04	77,9920273
Grupo etario 3	Animal 9	19 días	21,98	77,5536346
	Animal 10	20 días	20,34	77,8508453
	Animal 11	21 días	18,24	77,8429489
	Animal 12	20 días	20,34	77,70224
Grupo etario 4	Animal 13	38 días	18,04	77,9920273
	Animal 14	39 días	18,89	77,6938705
	Animal 15	41 días	20,11	77,8429489
	Animal 16	47 días	18,29	77,9920273

Figura A.8. Prueba de Shapiro-Wilk para establecer si los valores de expresión del gen delta presentan una distribución normal ($P \leq 0.05$).

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
delta	16	0.55210	9.075	4.381	0.00001

Figura A.9. Prueba de Kruskal-Wallis para detectar si existe diferencia significativa en los valores del gen delta entre grupos erarios ($P \leq 0.05$).

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

grupo	Obs	Rank Sum
1	4	13.00
2	4	30.00
3	4	35.00
4	4	58.00

chi-squared = 11.404 with 3 d.f.
probability = 0.0097

chi-squared with ties = 11.438 with 3 d.f.
probability = 0.0096

Figura A.10.1. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 1 y 2 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\delta - Kolmogorov Smirnov - 1 y 2.dta", clear
. ksmirnov delta, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
1:	0.7500	0.105	
2:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	0.7500	0.211	0.229

Figura A.10.2. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 1 y 3 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\delta - Kolmogorov Smirnov - 1 y 3.dta", clear
. ksmirnov delta, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
1:	0.7500	0.105	
3:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	0.7500	0.211	0.229

Figura A.10.3. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 1 y 4 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\delta - Kolmogorov Smirnov - 1 y 4.dta", clear
. ksmirnov delta, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
1:	1.0000	0.018	
4:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029

Figura A.10.4. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 2 y 3 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\delta - Kolmogorov Smirnov - 2 y 3.dta", clear
. ksmirnov delta, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
2:	0.5000	0.368	
3:	-0.2500	0.779	
Combined K-S:	0.5000	0.699	0.771

Figura A.10.5. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 2 y 4 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\delta - Kolmogorov Smirnov - 2 y 4.dta", clear
. ksmirnov delta, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
2:	1.0000	0.018	
4:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029

Figura A.10.6. Prueba de Kolmogorov-Smirnov de 2 muestras: comparación de los valores del gen delta entre los grupos etarios 3 y 4 ($P \leq 0.05$).

```
. use "D:\Stata 14\Stata14\delta - Kolmogorov Smirnov - 3 y 4.dta", clear
. ksmirnov delta, by(grupo) exact
```

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test for equality of distribution functions

Smaller group	D	P-value	Exact
3:	1.0000	0.018	
4:	0.0000	1.000	
Combined K-S:	1.0000	0.037	0.029