Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Evaluación in vitro de la actividad inmunogénica de una proteína recombinante de Pasteurella multocida aislada de casos de neumonías en alpacas (*Vicugna pacos*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Jorge Enrique MAXIMILIANO GUERRA

ASESOR

Abelardo L. MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2017



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

Maximiliano J. Evaluación in vitro de la actividad inmunogénica de una proteína recombinante de Pasteurella multocida aislada de casos de neumonías en alpacas (Vicugna pacos) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2017.

1020

561
11(F)
127

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:30 horas del día lunes 29 de mayo de 2017, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo y constituido por los siguientes miembros: Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (**Asesor**), Mg. Víctor Hugo Castillo Doloriert, Mg. Débora Alvarado Iparraguirre, Dra. Chris Evelyn Pinto Jiménez, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Evaluación *in vitro* de la actividad inmunogénica de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* aislada de casos de neumonías en alpacas *(Vicugna pacos)*" presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

JORGE ENRIQUE MAXIMILIANO GUERRA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE (19) DIECINUEVE**_____

A continuación, la Presidenta del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal**, al Bachiller en Medicina Veterinaria: **Jorge Enrique Maximiliano Guerra.**

Siendo las 12:30 horas del día lunes 29 de mayo de 2017, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo (P.P.T.C.)
Presidenta

Mg. Víctor Hugo Castillo Doloriert
Miembro (Jurado Externo)

Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández (P.A.T.C)
Asesor

Mg. Débora Alvarado Iparraguirre (P.P.D.E)
Miembro (Jurado Externo)

Dra. Chris Evelyn Pinto Jiménez
Miembro (Jurado Externo)

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

Dedicado a mis padres, Gregorio y Juana, su esfuerzo, apoyo, paciencia y comprensión, siendo el incentivo mas fuerte para seguir adelante. Mis mayores y sinceras gracias.

AGRADECIMIENTOS

Muchas veces uno se siente tan perdido en todo este mundo, muchas veces sin saber a dónde caminar, y a veces la suerte no te sonríe y aparece alguien te alumbra con una luz para guiarte. Quizás no sean las palabras más adecuadas para agradecer de todo corazón la confianza depositada en mi persona, pero creo que le debo mucho por ello, Dr Lenin Maturrano muchas gracias por apostar una vez más en mi persona a seguir este intrincado pero satisfactorio mundo de la investigación, gracias por asesorarme, guiarme y ayudarme en momentos claves. De todo corazón, Muchas Gracias.

La primera vez que llegué al laboratorio de Biología y Genética Molecular de la facultad de Veterinaria de la UNMSM, fue para el Curso de Neonatología en alpacas, aunque ya lo había conocido en el curso de inmunología en una clase sobre vacunas, la impresión fue grande que fue uno de los motivos por lo cual decidí entrar en este laboratorio. Dr. Raúl Rosadio Alcántara le agradezco infinitamente el poder haber ingresado a este laboratorio del cual tengo gratos recuerdos.

Luis Luna o más conocido como Luchín, llegaste en el momento preciso cuando necesitaba ayuda, amigo de verdad muchas gracias.

Raquel Hurtado, te pasaste, si no fuera por tu trabajo y análisis esta tesis no hubiera sido posible. Raquetita, no hay palabras suficientes para agradecerte todo lo que hiciste.

Ana, Rocío, Marcos, Juan, Guillermo, Dennys y David. Muchas gracias a todos ustedes por lo interesante en el aspecto profesional y divertido en el aspecto amical del día a día en el Laboratorio.

Y por último y no menos importante, agradezco a Innóvate Perú, ya que esta tesis es parte del Proyecto Innovate-Perú Contrato N°133-FINCyT-IB-2013: “Vacunología reversa: desarrollo de una vacuna de nueva generación para el control y/o prevención de la neumonía pasteurelosica en alpacas”.

Siento que faltan personas por agradecer, si es así mil disculpas si no los incluyo, la emoción es grande y tenía prisa…

INDICE

INDICE i

RESUMEN v

ABSTRACT vi

ABREVIATURAS vii

LISTA DE CUADROS viii

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE ANEXOS x

I. INTRODUCCION 1

III. ANTECEDENTES 4

1. Aspectos Generales 4

2. Aspectos Sanitarios 5

3. Aspectos inmunológicos 6

3.1. Desarrollo del Sistema Inmunitario en el Feto. 6

3.2. Respuesta Inmune en Animales Recién Nacidos. 7

3.3. Respuesta Inmune adquirida 8

3.4. Principales citoquinas implicadas en la respuesta inmune adquirida 9

3.4.1. Citoquinas implicadas en la respuesta inmune tipo Th1 11

3.4.1.1. Interferón – Gamma (IFN-γ) 11

3.4.1.2. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) 14

3.4.1.3. Interleucina 2 (IL-2) 15

3.4.2. Citoquinas implicadas en la respuesta inmune tipo Th2 20

3.4.2.1. Interleucina 4 (IL-4) 20

3.4.2.2. Interleucina 10 (IL-10) 24

4. Neumonías producidas por *Pasteurella multocida* 27

4.1. Pasteurella *multocida*. 28

4.1.1. Taxonomía y Filogenia 28

4.2. Características generales. 32

4.3. Epidemiología 34

4.4. Factores de Virulencia 35

4.4.1. Cápsula. 35

4.4.2. Lipopolisacárido. 36

4.4.3. Fimbrias y Adhesinas 38

4.4.4. Toxinas 40

4.4.5. Proteínas de adquisición y regulación de hierro. 41

4.4.6. Hialuronidasas 43

4.4.7. Proteínas de membrana externa 44

5. REAL-TIME PCR (qPCR) 45

5.1. Componentes 47

5.1.1. Templado o Molde (ADN o ADNc) 47

5.1.2. ADN polimerasa. 47

5.1.3. Cebadores o *primers* 47

5.1.4. Desoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTPs) 47

5.1.5. Fluoroforos con afinidad por el ADN.....47

5.1.6. Solucion Buffer, Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y agua.....48

5.2. Pasos de la qPCR......48

5.2.1. Desnaturalización.....48

5.2.2. Hibridación o *Annealing*.....48

5.2.3. Extensión, elongación o replicación.....48

5.3. Cuantificación relativa.....49

IV. HIPOTESIS.....51

V. OBJETIVOS.....52

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....53

1. Lugar de ejecución:.....53

2. Descripción del material experimental y Ensayos.....53

3. Toma de muestra de sangre......54

4. Aislamiento de PBMC y preparación del cultivo celular primario.....54

5. Desafío mediante el uso de la proteína recombinante P6-like......55

6. Extracción de ARN total.....56

7. Síntesis de ADNc......57

8. Estandarización de la técnica de qPCR para detección y cuantificación de citoquinas......57

9. Aplicación de la técnica de PCR en Tiempo Real.....59

10. Análisis de Niveles de Expresión.....60

8.1. Cuantificación relativa.....60

11. Análisis Estadístico 60

VII. RESULTADOS 61

1. Expresión de genes evaluados 61

1.1. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH) 61

1.2. TNF-α 63

1.3. IL-2 64

1.4. IFN-γ 66

1.5. IL-10 68

1.6. IL-4 70

VIII. DISCUSIÓN 76

IX. CONCLUSIONES 84

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 85

XI. APÉNDICE 112

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar *in vitro* la actividad inmunogénica de una proteína P6-Like recombinante procedente de un cultivo de *Pasteurella multocida* aislada de cuadros de neumonía en crías de alpacas. Se desafiaron cultivos de células mononucleares sangúineas periféricas (PBMC) con la proteína recombinante P6-like en una concentración de 10 ηg por muestra y desde las tres horas hasta las 72 horas se extrajo el ARN el cual sirvió para realizar la prueba RT-PCR en tiempo real, con la finalidad de observar los niveles de expresión de citoquinas de la respuesta inmune celular (TNF-α, IFN-γ e IL-2) y humoral (IL-10 e IL-4) a lo largo del tiempo establecido anteriormente mencionado. Se encontró que tanto las citoquinas con perfil Th1 como Th2 expresan un mayor número de veces respecto a PBMC no expuestos a la proteína recombinante, siendo las 24 a 48 horas los momentos de mayor expresión. Asimismo, se encontró una aparente tendencia hacia el perfil Th2, pero no en niveles que afecten la expresión de citoquinas del perfil Th1.

Palabras Clave: Pasteurella multocida, P6-like, alpaca, RT-PCR en Tiempo Real, cuantificación relativa.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate *in vitro* immunogenic activity of a recombinant protein P6-like from a P. multocida culture isolated from symptoms of pneumonia in alpacas. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures with recombinant protein P6-like were challenged in a concentration of 10 ηg per sample and from three hours to 72 hours, RNA was extracted which was used to perform real time RT-PCR test, in order to monitor levels cytokine expression of humoral immune responses (TNF-α, IFN-γ and IL-2) and humoral response (IL-10 and IL-4) along the aforementioned set time. We found that both Th1 cytokines and Th2 profiled express a greater number of times with respect to unexposed cells to the recombinant protein, being 24 to 48 hours times of increased expression. Likewise, an apparent trend towards the Th2 profile was found but not at levels that affect the expression of cytokines of the Th1 profile.

Keywords: *Pasteurella multocida*, P6-like, alpaca, RT-PCR in Real Time, relative quantification.

ABREVIATURAS

- **ADNc: ADN complementario.**
- **ARNm: ARN mensajero**
- **BLIMP 1: B lymphocyte-induced maturation protein-1)**
- **Cq: Ciclo umbral.**
- **GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada**
- **IFNγ: Interferon Gamma.**
- **IL10: Interleucina 10**
- **IL-2: Interleucina 2**
- **IL-4: Interleucina 4**
- **NF-κB: Factor nuclear Kappa-beta**
- **NK: Natural Killer**
- **PAF: factor activador de plaquetas**
- **PBMC: células mononucleares sanguíneas periféricas.**
- **qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.**
- **Ta: Temperatura de *annealing*.**
- **Td: temperatura de denaturación.**
- **Te: Temperatura de extensión.**
- **TLR: Toll-like receptor**
- **TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa.**

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies del genero *Pasteurella*. ……..…..30
Cuadro 2. Subespecies de *P. multocida*. ……..……31
Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos de los primers para la P6-like...…….54
Cuadro 4. Componentes para la síntesis de ADN…….……57
Cuadro 5. Condiciones para la síntesis de ADNc…….……57
Cuadro 6. Secuencias, tamaño, temperaturas de Annealing y referencias de las citoquinas usadas para la evaluación inmunogénica en alpacas……..…...58
Cuadro 7. Componentes para la la estandarización de la PCR para las citoquinas. ……58
Cuadro 8. Componentes para la qPCR de las muestras extraídas…..……....59
Cuadro 9. Condiciones para la qPCR de las muestras extraídas……...….59
Cuadro 10. Valores Cq del Gen GAPDH con respecto al tiempo de exposición…….62
Cuadro 11. Valores Cq del Gen de TNF-α con respecto al tiempo de exposición. ……64
Cuadro 12. Valores Cq para IL-2 con respecto al tiempo de exposición…...…65
Cuadro 13. Valores Cq para IFN-γ con respecto al tiempo de exposición…….67
Cuadro 14. Valores Cq para IL-10 con respecto al tiempo de exposición…….69
Cuadro 15. Valores Cq para IL-4 con respecto al tiempo de exposición……...71
Cuadro 16. Valores Cq para GAPDH sin estímulo a las 3, 24 y 48h de incubación..……..74
Cuadro 17. Valores Cq para TNF-α sin estímulo a las 3, 24 y 48h de incubación..……..74
Cuadro 18. Valores Cq para IL-10 sin estímulo a las 3, 24 y 48h de incubación..……..74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. P. multocida en placa de agar sangre……33
Figura 2. Representación esquemática de un ensayo de qPCR utilizando sondas Molecular Beacons (MB). ……46
Figura 3. Gráfico de las temperaturas de Melting para el gen GAPDH…….....62
Figura 4. Gráfico de las temperaturas de Melting para el gen de TNF-α…..…63
Figura 5. Niveles de expresión de TNF-α en linfocitos de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like……..……..64
Figura 6. Gráfico de las temperaturas de Melting para el gen de IL-2……..…65
Figura 7. Niveles de expresión de IL-2 en linfocitos de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like……..…..66
Figura 8. Gráfico de las temperaturas de Melting para IFN-γ. ……...…67
Figura 9. Niveles de expresión de IFN-γ en linfocitos de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. ……..……..68
Figura 10. Gráfico de las temperaturas de Melting para IL-10. ……..…...69
Figura 11. Niveles de expresión de IL-10 en linfocitos de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. ……70
Figura 12. Gráfico de las temperaturas de Melting para IL-4. …….....71
Figura 13. Niveles de expresión de IL-4 en linfocitos de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. ……..……72
Figura 14. Curva de expresión de las cinco citoquinas evaluados con respecto al tiempo de exposición. ……73
Figura 15: Gráfica comparativa de la expresíon relativa de IL-10 con y sin estimulo de la P6-like respecto al tiempo de exposición……..……..75
Figura 16: Gráfica comparativa de la expresíon relativa de TNF-α con y sin estimulo de la P6-like respecto al tiempo de exposición……..……..75

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de GAPDH. ……..……...…..112
Anexo 2. Cuadro de valores de temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de GAPDH. ……..……..…..113
Anexo 3. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de TNF-α. ……....……..….113
Anexo 4. Cuadro de valores de temperaturas de melting de las muestras utilizada para estandarización de TNF-α. ……..……..114
Anexo 5. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IL-10. ……..…..…...114
Anexo 6. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IL-10. ……115
Anexo 7. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IL-4. ……..……..…….……115
Anexo 8. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IL-4. ……..……..116
Anexo 9. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ. ……..……116
Anexo 10. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ. ……..…..117
Anexo 11. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IL-2. ……..……117
Anexo 12. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IL-2. ……..……...118
Anexo 13. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de GAPDH. ……..……..……118
Anexo 14. Curva de temperatura de melt de las 15 diluciones evaluadas para GAPDH……..……..…..119
Anexo 15. Curva de eficiencia Cq vs Log de la concentración de las 15 muestras utilizadas para estandarización de GAPDH. ……..……119

Anexo 16. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de TNF-α. ……..……..……...…120
Anexo 17. Curva de temperatura de melt de las 15 diluciones evaluadas....120
Anexo 18. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para TNF-α……..121
Anexo 19. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-10. ……..……..121
Anexo 20. Curva de temperatura de melting de las 15 diluciones evaluadas. ……..……...…122
Anexo 21. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para TNF-α…....122
Anexo 22. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-4…….…..…123
Anexo 23. Gráfico de temperaturas de melting de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-4. ……..……...……...123
Anexo 24. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IL-4……124
Anexo 25. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ…….……..……..……..124
Anexo 26. Gráfico de temperaturas de melting de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ…….……...…..125
Anexo 27. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IFN-γ……125
Anexo 28. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-2. ……..……126
Anexo 29. Gráfico de temperaturas de melting de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-2. ……..……126
Anexo 30. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IL-2……...127

I. INTRODUCCION

La alpaca, uno de los 4 camélidos sudamericanos en nuestro país, es sustento económico de varias familias en las regiones altoandinas del Perú (Ameghino y De Martini, 1991, Mamani *et al.* 2009). Esta importante actividad pecuaria sufre graves problemas sobre todo en el ámbito sanitario, específicamente por las altas tasas de mortalidad neonatales que pueden superar el 50% (Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza *et al*., 1988, Bustinza, 2001; Mamani *et al.* 2009; Cirilo *et al.,* 2012). Las principales causas de mortalidad neonatal son las causas infecciosas, siendo las neumonías de mayor casuística (Garmendia *et al*., 1986; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2001; Mamani *et al.* 2009).

Las neumonías son una de las principales causas de mortalidad en crías de alpacas (Garmendia *et al*., 1986; Ameghino y De Martini, 1991). Estas son causadas por diferentes agentes, entre virales y bacterianos, que coexisten en procesos infecciosos generando cuadros de neumonías agudas, siendo la *Pasteurella multocida* la principal bacteria involucrada en las infecciones neumónicas en alpacas, seguida de *Mannhemia haemolytica* que, individualmente o en conjunto con otros agentes infecciosos, generarían cuadros hiperagudos en crías durante la época de parición, afectando también a crías más grandes en épocas de estrés como el destete y la esquila (Rosadio *et al*., 1990; Cirilo *et al.,* 2012; Guzmán *et al*., 2013).

P. multocida, fue identificada por primera vez hace más de 125 años por Louis Pasteur, señalándolo como el agente causal del cólera aviar (Harper *et*

al., 2006). Dividida en cuatro subespecies: multocida, gallicida, séptica y la última descubierta denominada tigris (Capitini *et al*. 2002). *P. multocida* también es clasificada en serogrupos (A, B, D, E y F) basados en sus antígenos capsulares y además es clasificado en serotipos de acuerdo al lipopolisacarido usando el test de Heddleston (Heddleston *et al.,* 1972, Harper *et al*., 2006).

P. multocida cuenta con una variedad de factores de virulencia que juegan roles importantes en la patogénesis de la enfermedad, por ejemplo, la evasión de la respuesta inmune, la captación de hierro, etc. (Harper *et al*., 2006).

Las proteínas de membrana externa (OMP) son estructuras muy importantes en la patogénesis de la enfermedad. Muchos de estos compuestos están involucrados en la captación de Hierro, adhesión, entre otros, características necesarias para el establecimiento y supervivencia de la bacteria (Boyce *et al*., 2012). Varios OMP son inmunógenos y los anticuerpos producidos contra estas OMP demuestran una acción protectora fuerte. Tales antígenos se pueden usar como componentes de vacunas de subunidades. La inmunogenicidad de OMP seleccionadas de *P. multocida* ha sido demostrada en terneros (Kedrak y Borkowska, 2003), conejos (Lu *et al*, 1991) y gallinas (Zhang *et al*, 1994). Otros estudios indican que una OMP similar a una proteína de adhesión P6 de *Haemophilus influenzae* (P6-Like) induce a una mejor protección al inducir una respuesta significativa en producción de anticuerpos específicos, lo que lo hacen un muy buen inmunógeno para ser usado en vacunas (Kasten *et al*., 1995, Shivachandra *et al.,* 2017).

El presente estudio buscó determinar el perfil inmunogénico Th1 y Th2 de una proteína de membrana externa P6-like recombinante de *P. multocida* aislada de casos neumónicos fatales en alpacas obtenida mediante tecnología recombinante, donde fue seleccionada la proteína *in silico*, clonada, expresada y purificada, para luego ser enfrentados con PBMC de alpaca en una concentración de 10ηg por cultivo. Estos cultivos fueron colocados a 38°C durante las 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se extrajeron el ARNm de cada cultivo y mediante la prueba de RT-PCR en Tiempo Real se

observaron los niveles de expresión de citoquinas de perfil Th1 y Th2. Este estudio tiene como objetivo observar el perfil citocínico que estimula la P6-Like recombinante. Esta evaluación *in vitro* forma parte de la elaboración de una vacuna de última generación para la prevención de neumonías pasteurelósicas en crías de alpacas.

II. ANTECEDENTES

1. Aspectos Generales

En el Perú, la crianza de camélidos sudamericanos es una de las actividades económicas más importantes en las regiones altoandinas de nuestro país (Ameghino y De Martini, 1991), siendo la alpaca una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos de mayor aprovechamiento en nuestro país. De la Tribu Lamini, Familia Camelidae, Suborden Tylopoda, Orden Artiodactyla y Clase mammalia; la alpaca es una parte importante en la economía de las comunidades campesinas altoandinas, principalmente por el uso de su carne y fibra (Wheeler, 1995). Esta especie se encuentra muy bien adaptada a la región de los andes peruanos, su crianza prospera a pesar de las condiciones adversas propias de la región, lo cual le da una clara ventaja sobre otras especies de animales que viven bajo esas mismas condiciones (Garnica y Bravo, 2001).

El último censo agropecuario en el 2012 coloca al Perú como el principal productor de alpacas en el mundo, sobrepasando los 3.5 millones de animales, siendo las regiones de Puno y Cusco las de mayor población (INEI, 2012)

Un factor que limita el aprovechamiento y productividad de esta especie es la aparición de enfermedades de carácter infeccioso, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, sobre todo en poblaciones vulnerables como son las crías, siendo las neumonías pasteurelósicas una de las principales causas de mortalidad en crías de alpacas (Garmendia *et al.*, 1986; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2001).

2. Aspectos Sanitarios

Las alpacas y llamas, al igual que otras especies domésticas, presentan las mayores tasas de morbilidad y mortalidad en los primeros meses de vida. En un estudio realizado en Estados Unidos se determinó una mortalidad del 2,1% en llamas y alpacas en el periodo pre destete (Sharpe *et al*., 2009). En el Reino Unido en un estudio epidemiológico realizado en 689 camélidos de edades comprendidas entre menos de seis meses y los diez años de vida se determinaron mortalidades entre el 2,7 y 3,3% en llamas y entre el 3,5 y el 6,9 % en alpacas. No obstante, entre el 17 y 33% de las muertes de alpacas correspondieron a animales menores de seis meses (Davis *et al*., 1998; Wright *et al*., 1998). En otro estudio, también en el Reino Unido, se indica a los problemas sanitarios en las explotaciones de camélidos como una de las causas más importantes de mortalidad neonatal y periparto (D´Alterio *et al*., 2006).

En Sudamérica, las condiciones de explotación del altiplano, son factores que inducen a que las tasas de mortalidad sean mucho más elevadas. En un centro de investigación de camélidos en Perú, la mortalidad en el periodo pre-destete en un lapso de tres años fue del 12%, llegando incluso a superar el 50% o hasta el 70% de mortalidad en crías de alpaca. (Ramírez, 1987; Bustinza *et al*., 1988; FAO, 2005). Las principales causas de mortalidad neonatal en estas especies son las enfermedades infecciosas y el manejo inadecuado, puesto que las enfermedades más frecuentes en los neonatos se asocian a fallos en la transferencia de la inmunidad maternal (Garmendia *et al*, 1986; Ameghino y De Martini, 1991).

La alpaca al presentar una placenta de tipo epiteliocorial difusa impide la transferencia pasiva de inmunoglobulinas de la madre al feto durante la gestación, razón por la cual las crías de alpacas nacen con nulos títulos de anticuerpos y su inmunidad inicial depende exclusivamente de las inmunoglobulinas presentes en el calostro, el cual debe ser consumido y absorbido en cantidades adecuadas durante las primeras 12 horas de nacido (Ameghino y De Martini, 1991; Wernery, 2001). Consecuentemente, las madres

tienen que proveer de inmunoglobulinas, mediante el calostro, a sus crías y las fallas que puedan observarse en esta transferencia ocasionaría una elevada mortalidad de neonatos (Quispe, 2009).

3. Aspectos inmunológicos

3.1. Desarrollo del Sistema Inmunitario en el Feto.

El desarrollo del sistema inmune de los mamíferos sigue un patrón constante. El timo es el primer órgano linfoide que se desarrolla, seguido de cerca por los órganos linfoides secundarios (Tizard, 2009). El esbozo del timo en los fetos de alpacas es visible recién a los 40 días de edad, observándose los timocitos a los 40 días de gestación, por ello se presume que estas células son pro timocitos o linfoblastos que están siendo reclutados desde órganos hematopoyéticos fetales hacia el timo primitivo para poblarlo, y luego iniciar el proceso de maduración tímica que originará a los primeros linfocitos T (Montenegro *et al*., 2006).

En el timo fetal de alpaca se pueden apreciar grupos celulares hematopoyéticos indiferenciados, que forman nidos compatibles con células eritroblásticas. Estas células se ubican en las cavidades del timo inmaduro de 60 días, pero cuando el timo comienza a organizarse, sus cavidades se pueblan de timocitos, definiéndose la corteza y médula. Las células se ubican principalmente en las áreas trabeculares, subcapsulares, y ocasionalmente en la corteza periférica (Montenegro *et al*., 2006).

Los linfocitos B aparecen pronto después del desarrollo del bazo y de los nódulos linfáticos, pero los anticuerpos no se sintetizan hasta el final de la etapa fetal, en muchos casos (Tizard, 2009).

En alpacas al día 55 de gestación ya se encuentra presente estructuralmente el bazo, encapsulado y con parénquima con tejido conectivo embrionario con nidos hematopoyéticos y entramado reticular, lo cual es indicativo que el tejido está diferenciándose y especializándose en tejido conjuntivo. La diferenciación de la pulpa blanca y roja del parénquima esplénico

se observó en fetos de 120 días. A partir de esa edad se observa una mayor consolidación de la citoarquitectura y también los cúmulos linfoides están mejor organizados, pues se les aprecia como una malla compuesta de células y fibras reticulares que atrapan linfocitos, alrededor de una arteriola central; pudiéndoseles denominar como folículo linfoide inmaduro (Arias *et al*., 2011).

La capacidad del feto para responder a los antígenos se desarrolla muy rápidamente tras la formación de los órganos linfoides, pero no todos los antígenos son igualmente capaces de estimular el tejido linfoide fetal. El sistema inmune se desarrolla en una serie de etapas y en cada una se capacita al feto para responder a más antígenos. Estas etapas dependen del incremento gradual en el uso de la conversión génica o mutación somática para incrementar la diversidad de anticuerpos (Tizard, 2009).

3.2. Respuesta Inmune en Animales Recién Nacidos.

El sistema inmune en mamíferos está constituido, en primera instancia por una inmunidad innata y una inmunidad adaptativa. La inmunidad innata viene a ser la primera línea de defensa en los mamíferos, como el sistema inmune adquirido es completamente virgen en el momento del nacimiento, es muy lento en responder a los agentes invasores, además, el suero de animales recién nacidos carece de algunos componentes del complemento, lo que da como resultado una actividad opsonizante débil que refleja en una mayor susceptibilidad a la infección. Por lo tanto, las respuestas inmunes innatas son críticas para la supervivencia durante las primeras semanas de vida (Tizard, 2009).

Los animales recién nacidos producen una gran variedad de moléculas antimicrobianas, estas incluyen componentes del complemento en concentraciones bajas (Ejm: lectinas), así como péptidos (defensinas, lactoferrina, y lisozima). Un ejemplo es la producción de proteínas surfactantes A y D en el pulmón de cordero fetal preparto, así como la β-defensina 1 y el receptor TLR4. Como resultado, los agentes patógenos son opsonizados y eliminados con relativa eficacia y los TLR se encuentran presentes y

funcionales. Cerca del nacimiento, la capacidad fagocítica y bactericida de los neutrófilos disminuye como resultado del incremento de los niveles de esteroides. Por ejemplo, en potrillos recién nacidos los neutrófilos se desplazan con relativa lentitud a comparación de los neutrófilos de sus madres. No obstante, la actividad fagocítica y bactericida en el potro fetal a la de la yegua. Tras el nacimiento, los macrófagos muestran respuestas quimiotácticas deprimidas y a diferencia de los adultos, además son capaces de tolerar el crecimiento de algunos virus. Esta actividad antiviral será adquirida gradualmente con el tiempo (Tizard, 2009).

3.3. Respuesta Inmune adquirida

Tras desarrollarse en el ambiente estéril del útero, los mamíferos nacen en un ambiente rico en microorganismos, siendo capaces de desarrollar respuestas inmunes, tanto innatas como adquiridas, al momento de nacer. Como sabemos, la respuesta inmune innata es la primera en responder, luego de esta respuesta el organismo debe desencadenar una respuesta específica contra el patógeno recientemente combatido. La respuesta inmune adquirida o también denominada adaptativa es la siguiente línea de defensa que, mediante muchos recursos más específicos como son los linfocitos T y B, median la eliminación de los patógenos a través de vías de respuestas celulares y/o humorales, además de originar memoria inmunológica. (Goldsby *et al*., 2002, Burmester, 2003; Tizard, 2009).

Todos estos mecanismos de respuesta inmune innata y adquirida, son desencadenados a través de señales intercelulares que permiten la comunicación para realizar alguna función. Estas señales bioquímicas son realizadas por las citoquinas, que rigen y modulan la respuesta inmune en los mamíferos, ya sea una respuesta inmune celular o una respuesta inmune humoral.

En recién nacidos, cualquier respuesta inmune adquirida que se desarrolle debe ser de tipo primario, con un periodo de latencia prolongado y baja concentración de anticuerpos. Es sabido que los animales recién nacidos

desarrollan mayoritariamente respuestas inmunes del tipo Th2 más que Th1. Los linfocitos Th1 del recién nacido parecen ser muy sensibles a la apoptosis inducida por la Interleuquina-4 (IL-4) e IL-3. Algunas citoquinas de la respuesta Th1, como el IFN-γ, al parecer dañan la placenta, por ello, esta preferencia por las respuestas Th2 no es accidental y posiblemente sea debido a la influencia hormonal durante la gestación. Las respuestas inmunes generalmente revierten al equilibrado patrón del adulto durante los primeros meses de vida (Tizard, 2009).

En alpacas la expresión de citoquinas (tanto Th1 y Th2) se puede detectar en el primer día de edad aún en animales neonatos que no han consumido calostro. Estas se expresan desde el nacimiento y en forma ascendente y gradual hasta la quinta semana de nacimiento. Se sabe que los animales enfermos expresan una mayor cantidad relativa de citoquinas, tanto a las respuestas Th1 como Th2, en relación a los animales recién nacidos que no han consumido calostro y los animales sanos (Chiok, 2012).

3.4. Principales citoquinas implicadas en la respuesta inmune adquirida

El sistema inmune funciona a través de muchos tipos celulares, emitiendo y recibiendo mensajes en forma de señales químicas. Estas señales son recibidas en su célula diana para estimular una función concreta como dividirse, no dividirse, estimular secreción de otras moléculas e incluso la apoptosis. Estas moléculas se denominan citoquinas. (Tizard, 2009).

En general, las citoquinas son proteínas segregadas por diferentes células del sistema inmune a manera de mensaje para activar una cadena de eventos frente a un patógeno determinado y cuyo efecto neto depende del tiempo que dura la liberación de la citoquina, el ambiente local donde actúa, la presencia de elementos sinérgicos o competidores, densidad de sus receptores y capacidad de respuesta del tejido a la citoquina. La inhibición mutua entre las respuestas tipo Th1 y Th2 polarizan el tipo de respuesta final frente a un patógeno determinado, siendo la regulación de las células T a partir de citoquinas anti inflamatorias un evento crucial en esta diferenciación (Opal y

Depalo, 2000). Sin embargo, y a pesar del paradigma Th1-Th2, se han ido hallando otros subtipos de células T CD4+ como poblaciones de células Th1 que producen IL-10 e IFN-γ simultáneamente, rompiendo el esquema clásico y demostrando la plasticidad de las células que conforman el sistema inmune. El análisis de citoquinas *in vivo* es extremadamente difícil, debido a su secreción y dispersión rápida, y su producción en baja cantidad, por lo que el uso de métodos tales como el aislamiento de células y re- estimulación *in vitro* ha sido necesario. Contrariamente, el uso de estos métodos tiende a perder las condiciones microambientales normales dando lugar a perfiles de expresión génica alterados. Por este motivo, se implementó el uso de modelos murinos genéticamente modificados, "reporteros bicistrónicos" que proveen información de lo que ocurre *in vivo* (Kalies *et al*., 2008).

Los linfocitos T de memoria son subpoblaciones de estas células que logran memorizar la expresión de moléculas efectoras como las citoquinas, en particular aquellas que le han sido instruidas para expresar durante su activación primaria. La expresión es transitoria, durante un evento de re-exposición al mismo antígeno (Tykocinski *et al*., 2005).

En estos últimos tiempos se ha evidenciado transcripción de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-10) en modelos murinos a nivel basal en tejido linfoide durante estados de reposo y no activación. Estos niveles basales se asocian a zonas específicas de células T o B. Tras exposición directa a antígenos sanguíneos en bazo se observan cambios en la transcripción del ARNm de las mencionadas citoquinas. Estos cambios son rápidos, transitorios, limitados al compartimento linfoide, y preceden la proliferación celular, aunque la transcripción de citoquinas tiene lugar dentro de las 72 horas post inoculación de antígenos derivados de sangre (Kalies *et al*., 2008). La capacidad de producción de citoquinas es variable entre individuos y depende de polimorfismos génicos (Budak *et al*., 2007).

De manera convencional, las citoquinas juegan parte primordial en determinar una respuesta inmune de tipo protectiva. Se han logrado grandes

avances en el estudio de las respuestas de citoquinas ante una variedad de agentes infecciosos, además de su rol en la regulación de las respuestas inflamatorias. Los Linfocitos T helper (Th) se subdividen en Linfocitos Th1 y Th2 de acuerdo al patrón de citoquinas que sintetizan. La susceptibilidad o resistencia a ciertas infecciones está íntimamente ligada con la expresión particular de patrones de citoquinas. El análisis de estos perfiles permite clarificar las propiedades funcionales de las células del sistema inmune, tanto para investigación como para diagnóstico clínico (Odbileg *et al*., 2008).

Odbileg *et al* (2006) lograron clonar, secuenciar y analizar el ADNc de los genes de las citoquinas de respuesta Th1 (IL-2, IL-12p35 e IFN-γ) y Th2 (IL-4, IL-10 and IL-13) del camello bactriano (*Camelus bactrianus*) y la llama (*Lama glama*). Además, se encontró que estas citoquinas tienen 465, 402, 537, 669, 411, y 501 pares de base (pb) de longitud con marcos de lectura abiertos (ORF) codificando 154, 133, 178, 222, 136, y 166 aminoácidos, respectivamente. La homología de las secuencias nucleotídicas se ubica entre 58.8 a 100% frente a las secuencias publicadas para otros mamíferos, incluyendo la llama, cerdo, vaca, caballo, humano y ratón. El ADNc tuvo la homología más alta con los miembros del orden Artiodactyla (porcinos y vacunos) y Perissodactyla (equinos), y especialmente con las secuencias de llama (*Lama glama*) obtenidas por los mismos autores. Para lograrlo ellos emplearon oligonucleótidos diseñados para las secuencias publicadas en vacunos. (El-Boshy *et al*., 2009).

Convencionalmente, las citoquinas han sido clasificadas de acuerdo al tipo de respuesta inmune son capaces de promover en conjunto, aunque esta clasificación va perdiendo fuerza a medida que se descubren diferentes patrones de la respuesta inmune, como es el caso de la respuesta Th17.

3.4.1. Citoquinas implicadas en la respuesta inmune tipo Th1

3.4.1.1. Interferón – Gamma (IFN-γ)

Los interferones representan una de las primeras líneas de defensa frente a infecciones virales, han sido clasificados en grupo I, II y III de acuerdo a su

secuencia aminoacídica, la afinidad a su receptor y su localización en el genoma celular (Schroder *et al*., 2004). El IFN-γ llamado interferón inmunitario o de tipo II, tiene un rol importante en la activación de los macrófagos, respuesta inmunitaria innata y respuesta celular adaptativa.

Producida mayormente en células Natural Killer (NK) y linfocitos Th1 activados, esta citoquina tiene efectos múltiples sobre las mismas NK, macrófagos y linfocitos T (Schroder *et al*., 2004).

Varios estudios indican su participación en procesos inflamatorios agudos debido a su influencia en la migración de células inflamatorias, como son los neutrófilos y macrófagos, por lo que frecuentemente se le clasifica dentro de las citoquinas proinflamatorias. Otros estudios han demostrado una actividad anti inflamatoria de esta citoquina. Un ejemplo es durante procesos agudos de pancreatitis provocada por inyección de ceruleína en ratones. Tal actividad se atribuye a la acetilación del factor Stat 1 (una de las principales señales traductoras) que a su vez inhibe la activación del factor Nuclear κB (NF-κB). Este último promueve la transcripción de factores proinflamatorios como TNF-α e incluso COX-2 (Hayashi et al, 2007).

Se ha demostrado que la producción de IFN-γ a partir de las células NK son importantes en la respuesta inmune inicial y que las células T se convierten en la principal fuente de IFN-γ en las fases tardías de las respuesta inmune (Schroder *et al*., 2004).

El IFN-γ induce la transcripción génica a través de la activación de la vía Janus Kinasa (Jak) - traductor de señal y activador transcripcional 1 (STAT-1), más conocida como la vía Jak-STAT, la cual permite la expresión de diversas proteínas de respuesta inmune (Mead *et al*., 2003; Tau *et al*., 2000). El IFN-γ está involucrado además en la expresión no solo de IL-12, sino además, de su receptor celular IL12R (Wakil *et al*., 1998). Su expresión alcanza su máximo a las 24 horas post inoculación de antígenos derivados de sangre en tejido linfoide de bazo de ratón, donde se circunscribe a la zona correspondiente a

Linfocitos T. A las 72 horas, la producción de ARNm decae, acompañando el momento máximo de proliferación de células T (Kalies *et al*., 2008).

Esta citoquina tiene efectos pleiotrópicos y diversos como regulación positiva de la expresión de moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), inducción de la formación del complejo inmunoproteosoma e inducción de una variedad de moléculas efectoras antimicrobianas en macrófagos y otras células, lo que principalmente mejora la actividad antimicrobiana. Por otro lado, posee a su vez propiedades anti inflamatorias a través de la inducción del supresor de señal de citoquinas 1. Asimismo, tiene efectos significativos sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos T. Por tanto, su producción es crítica para la eliminación de virus y diversos organismos intracelulares como bacterias y parásitos protozoarios; así como para la respuesta frente a microorganismos menos estudiados como protozoarios del género *Cryptosporidium, Microsporidium* y *Entamoeba histolytica*, algunos de los cuales afectan el tracto digestivo de varias especies de mamíferos incluyendo al hombre (Lykens *et al*., 2010).

En ovejas infectadas con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se ha demostrado la participación necesaria de IFN-γ para promover una correcta respuesta inmune donde coexistan las respuestas celulares y las respuestas humorales, primordialmente en ovejas infectadas pero asintomáticas y en la versión paucibacilar de la enfermedad (Gillan *et al*., 2010).

Se han ensayado aplicaciones biomédicas para las versiones sintéticas y derivadas de cultivos celulares para esta citoquina, particularmente en casos de infección crónica por Mycobacterium y en pacientes con presentación de tumores. Aunque es bien tolerada en pacientes humanos con diversos tumores o hepatitis virales, su toxicidad es dependiente de dosis, además de tener sendos efectos secundarios (Hayashi *et al*., 2007).

3.4.1.2. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α)

El TNF-α, denominado así por su habilidad para destruir células tumorales y causar necrosis hemorrágica en tumores en ratones (Carswell *et al*., 1975), es una citoquina pertenece al grupo de las citoquinas activadas a través de NF-κB que estimulan las respuestas sistémicas (Lu *et al*., 2009). Producidos principalmente por macrófagos, puede ser producido también otros tipos celulares como los linfocitos CD4+, NK, neutrófilos, masticitos y neuronas; por lo que se considera una citoquina de la inunidad innata como adquirida (Hamerman *et al*., 2005; Vivier *et al*., 2011; Gabrielli *et al*., 2016)

El TNF-α, junto a IL1 e IL6, participan como mediadores principales de la inmunidad natural contra bacterias Gram negativas y son mediadores clave de las respuestas inflamatorias y el shock séptico. Como parte de la respuesta inmune celular, esta citoquina es necesaria como coestimulador para la producción de IFN-γ (Odbileg *et al*., 2008).

El daño que produce en los tejidos durante procesos sépticos o inflamatorios se debe a su actividad sobre la respuesta de los neutrófilos en la producción y liberación de elastasa, ión superóxido, peróxido de hidrógeno, leucotrieno B1, factor activador de plaquetas (PAF) y tromboxano A2, los que en conjunto generan el escenario de inflamación con la consiguiente remodelación del tejido afectado (Aldridge, 2002).

La actividad de esta citoquina parece ser inhibida por antibióticos macrólidos como la eritromicina, que administrada previamente con α toxina de *C. perfringens* logra disminuir la liberación de esta citoquina, mejorando la producción de citoquinas de respuesta Th1 como IFN-γ e IL-2 y de respuesta Th2 como IL-4, mejorando la tasa de supervivencia en ratones (Oda *et al*., 2008).

Se han hecho grandes progresos en relación a las enfermedades inflamatorias intestinales, donde se vienen practicando terapias que involucran el bloqueo activo de TNF-α e IL-1 con gran éxito en la supresión de signos

clínicos de enteritis, particularmente en el caso de colitis ulcerativa en humanos (Rutgeerts *et al*., 2009). Por otra parte, esta citoquina ha sido asociada a cáncer de colon junto a IL-6 (Koller *et al*., 2010); mientras que su deficiencia en ratones infectados con *Mycobacterium avium* promueve la diseminación de estas bacterias y la aparición de focos granulomatosos múltiples y en lugares distantes al foco de infección primaria (Coussens, 2004).

3.4.1.3. Interleucina 2 (IL-2)

Su función principal radica en la expansión *in vivo* de linfocitos; aunque adicionalmente participa de la contracción de respuestas inflamatorias, programación de linfocitos para iniciar la apoptosis y crecimiento y supervivencia de Linfocitos T reguladores (Treg). Estas funciones adicionales se correlacionan con la expresión de cofactores como Blimp1 (Martins *et al*., 2008). La fuente de esta proteína son otras células T (incluyendo linfocitos T autoreactivos), constituyendo un feedback negativo regulatorio cuya ausencia promueve el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes como gastritis, tiroiditis, neuropatía severa y diabetes tipo 1 que suelen prevenirse tras la administración de IL-2 exógena (Setoguchi *et al*., 2005).

En condiciones normales, esta citoquina es producida principalmente por linfocitos T CD4+ en órganos linfoides secundarios y, en menor extensión por células CD8+ (luego de la activación por antígeno) y células NK. Sólo en determinadas condiciones puede ser producida en bajas cantidades por células dendríticas activadas y mastocitos. Su síntesis consta de varios mecanismos regulatorios incluyendo silenciamiento de su gen codificante a través del factor de transcripción BLIMP1, el cual es activado por el mismo IL-2 y que en respuesta suprime la síntesis proteica de esta citoquina proveyendo de un mecanismo de regulación de retroalimentación negativa. Las células T efectoras que se han convertido en células de memoria central expresan niveles bajos de BLIMP1 lo que les permite mantener niveles adecuados de IL-2. Sin embargo, la exposición prolongada a antígenos (incluyendo los autoantígenos) promueve nuevamente la producción de BLIMP1 lo que reduce su capacidad de producir IL-2 a medida que se diferencian terminalmente o se

agotan. Tal estímulo también puede derivar en la expresión de ligandos de muerte promoviendo la apoptosis de estas células durante el mecanismo de tolerancia central y periférica (Boyman y Sprent, 2012).

Para ejercer su actividad, las células deben expresar el receptor IL2R de alta afinidad (trimérico) o el de baja afinidad (dimérico) dependiendo de la coexistencia de las cadenas α (CD25), β (CD122) y γ_c, siendo funcionales en la señalización las cadenas β y γ (expresadas en niveles bajos pero significativos en células CD8+ vírgenes y CD4+ de memoria, y en altas cantidades en células CD8+ de memoria y células NK). La cadena α participa de la afinidad por el ligando (expresada de manera transitoria y en niveles elevados en células CD4 y CD8+ luego de su activación a través de su TCR) cuya expresión está regulada por STAT5. Estudios en humanos han demostrado que IL-2 se une primeramente a CD25 con alta afinidad, lo que promueve un cambio estructural en IL-2 el cual luego es capaz de unirse a CD122 y γ_c, el complejo es rápidamente internalizado y el trímero IL-2-CD122- γc es subsecuentemente degradado para que CD25 regresa a la superficie celular para ser reutilizado. CD122 y γ_c son los componentes de señalización al poseer motivos señalizadores en sus colas intracitoplasmáticas. La señalización tiene varias vías como la vía JAK-STAT, PI3K-AKT y la vía MAPK (Boyman y Sprent, 2012).

Su actividad sobre las células CD8 se realiza sobre expansión primaria, contracción, generación de memoria y expansión secundaria, actuando esencialmente de manera autocrina o de forma paracrina a través de células T CD4+ tras su activación a través de células dendríticas presentadoras de antígeno. Asimismo, la duración del estímulo de IL-2 determina el destino de aquellos linfocitos que son estimulados, de modo que aquella población de linfocitos T que expresan cantidades bajas de CD25 por periodos cortos termina favoreciendo la expresión de IL7R para que se diferencien en células T de memoria. Por otro lado, aquella subpoblación que expresa altas cantidades de CD25 en superficie por uno o dos días tras la exposición al antígeno son

muy sensibles a IL-2 lo que determina su diferenciación en células CD8+ y CD4+ efectoras de corta vida (Boyman y Sprent, 2012).

La señal de IL-2 regula positivamente la expresión de CD25 y amplifica la capacidad supresora de las células T reguladoras al mantener niveles altos de expresión de FOXP3, aunque por sí mismas estas células no pueden producir grandes cantidades de IL-2 sino que dependen de su actividad paracrina. En ausencia de IL-2, además de disminuir la cantidad de células Treg, se produce aumento de células Th17 lo que incrementa la presentación de enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios. En las células Th2, IL2 induce la expresión temprana de IL4Rα y mantiene accesible la configuración del locus de IL4 durante las últimas fases de diferenciación hacia Th2. Aún más, IL-2 influye sobre la accesibilidad del locus de IL-13 en células Th2. Por tanto la eficiencia en la expresión de IL-2 influye drásticamente en el destino de las células T activadas ya que niveles sub óptimos de IL2 impiden una correcta respuesta primaria y secundaria. En células presentadoras de antígeno, se cree que serviría para la presentación en forma trans de IL15 e IL2 a células T específicas, de modo que células dendríticas activadas expresarían CD25 en su superficie (Boyman y Sprent, 2012).

El IL-2Rβ es componente del IL-15R, mientras que γc es una subunidad de IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R e IL-21R. Se considera por tanto que IL2 es el factor de crecimiento más importante de linfocitos T recientemente y específicamente activados por antígenos, expandiendo su número significativamente. Además de esta función, la presencia masiva de IL-2 sensibiliza a los linfocitos T que están en pleno crecimiento y maduración para que ingresen en procesos de apoptosis o muerte celular inducida por activación (AICD, siglas en inglés) ante una segunda estimulación a través de su TCR (Malek *et al*., 2002).

Adicionalmente, esta proteína es crucial para el mantenimiento de la auto tolerancia inmunológica, siendo crítica para la diferenciación, mantenimiento y supervivencia de células T reguladoras adaptativas (A-Treg) a través de la inducción de expresión del gen FoxP3 como mecanismo de control de la

inflamación. Tal mecanismo de regulación es crucial en la inmunidad de mucosa intestinal en vista de los procesos inflamatorios provocados por estímulos masivos y constantes de las bacterias comensales intestinales y los antígenos alimentarios. Esta regulación puede ser estimulada empleando ácido retinoico e incluso sus derivados y requiere a su vez de la participación de TGF-β (Benson *et al*, 2007).

Los mecanismos a través de los cuales ejerce esta función regulatoria tienen lugar durante y después del desarrollo fetal, durante los procesos de selección negativa en la tolerancia central tímica y durante la vida normal del individuo. Se ha encontrado que existe gran cantidad de células T que expresan niveles altos de transcritos de IL-2 a nivel de la región cortico medular, un sitio tímico clave para la selección y maduración de células T. Favoreciendo este hallazgo, se ha demostrado que células CD4+ CD8+, timocitos intermedios de transición, expresan las 3 subunidades de IL-2R (Malek *et al*., 2002). El mecanismo por el cual ejerce su efecto en el desarrollo de estas células reguladoras se relaciona a la capacidad de las células regulatorias para suprimir la transcripción de ARNm de IL-2 en sus células blanco, impidiendo a los linfocitos T responder al estímulo proliferativo del mismo IL-2 (Thornton *et al*., 2004).

Los ratones deficientes en IL-2 suelen tener mortalidad del 50% entre la cuarta y sexta semana de edad a causa de anemia hemolítica autoinmune, los animales que sobreviven desarrollan enfermedad inflamatoria intestinal histológicamente similar a las lesiones observadas en colitis ulcerativa en humanos. Estas lesiones se caracterizan por presentar elongación de las criptas y proliferación de células epiteliales entéricas, depleción de células de Goblet, abscesos ocasionales en criptas y presencia de células inflamatorias en mucosa (Meijssen *et al*., 1998).

Los niveles de IL-2 varían considerablemente en modelos murinos, dependiendo de los tipos celulares que los producen y lo consumen. En reposo, los niveles más altos son producidos por células T CD4+ con niveles intermedios de CD25, seguidos de CD4 $CD25^{low}$, CD4 $CD25^{hi}$, células NK y

Células T CD8+. Notablemente, tanto las células T con TCRγδ como TCRαβ producen cantidades elevadas de IL-2. Inmediatamente después de la activación linfocitaria, los niveles de expresión de IL-2 aumentan rápidamente y por varios días en órganos linfoides secundarios donde es consumido por linfocitos CD4, CD8 y Treg (Boyman y Sprent, 2012).

En células T CD4 (+) vírgenes el *locus* codificante de IL-2 se mantiene en estado transcripcionalmente silente hasta la presentación de antígenos hacia su TCR, en el contexto de la existencia de una molécula MHC apropiada y señales coestimuladoras. Una región regulatoria mínima esencial se localiza en un segmento de 300pb antes del sitio de inicio de la transcripción. En este lugar, miembros de las familias NF-κB, AP-1 y NFAT interactúan para modular la transcripción del gen. Se han observado cambios en la estructura de la cromatina que acompañan la inducción de la transcripción de IL-2. Se ha identificado un tipo de regulación bifásica de la transcripción de esta citoquina, donde la fase tardía (hasta 18 horas posteriores a la presentación de antígeno) depende de cRel, CD28 y TNFR mientras que la fase temprana (hasta 6 horas posteriores a la presentación de antígeno) depende sólo parcialmente de las primeras dos moléculas y es independiente de TNFR. Esto junto a la reorganización de la cromatina permitiría la producción rápida de IL-2 durante reto secundario (McKarns y Schwartz, 2008).

De esta manera el locus de IL-2 permanece en un lugar genómico donde la estructura de la cromatina impide que se una a sus factores transcripcionales y los mecanismos anteriormente descritos promoverían el remodelamiento de la cromatina en los sitios promotores y reguladores del *locus* de modo que estos sitios queden “abiertos” o “disponibles” para tales factores de transcripción. Para tal efecto, son necesarias las señales coestimulatorias de CD28 tras la formación del complejo TCR-Ag ya que sin ellas se producen los eventos de anergia clonal que forman parte del mecanismo de tolerancia periférica (Thomas *et al.*, 2007).

Este tipo de mecanismo ha sido estudiado en ratones, donde a través de la técnica de precipitación de cromatina (chIP) se ha identificado acetilación de las histonas H3-H4 y demetilación de la histona H3 en la posición Lys-4 (H3/H4) en exón 1 del gen IL-2 en células de linaje T competentes de ratón. La acetilación H3/H4 se ha observado en células que se encuentran transcribiendo activamente el gen, mientras que la demetilación H3/H4 se observa particularmente durante el estado silente de la célula T. Esta regulación epigenética se mantendría para estos genes que deben permanecer silentes por periodos largos de tiempo ya que su expresión es temporal para regresar a un estado de "off" tan pronto desaparece el estímulo (Adachi y Rothenberg, 2005).

Tal acetilación es dependiente de enzimas acetiltransferasas, las que inhiben la compactación del nucleosoma y generan sitios de unión para enzimas dependientes de ATP remodeladoras de cromatina. Tal efecto es de importancia durante el desarrollo de células T en Timo, donde son seleccionadas y forzadas hacia anergia clonal dependiente de factores como Ikaros, el cual es sensible al bloqueo de IL2R y CD28 (Thomas *et al*., 2007).

En estudios hechos en ratones inoculados vía intravenosa con antígenos derivados de sangre, se ha observado que la producción de ARNm de IL-2 toma lugar de manera gradual entre las 9 y 24 horas post exposición. Similarmente a lo observado para IFN-γ, la producción de ARNm está reservada para la zona de células T en pulpa blanca de bazo murino y decae a las 72 horas post inoculación para acompañar el máximo índice de proliferación linfoide (Kalies *et al*., 2008).

3.4.2. Citoquinas implicadas en la respuesta inmune tipo Th2

3.4.2.1. Interleucina 4 (IL-4)

La IL-4 es una glicoproteína de 20 KDa de peso molecular, originalmente identificada por su actividad de sostener el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, sin embargo, ahora se conoce que ejerce múltiples actividades en diferentes tipos celulares. Las células productoras de IL-4 son las células NK,

basófilos, eosinófilos, mastocitos y las células T CD-4; sin embargo, no se ha determinado cuál de estos es la fuente principal de IL-4 (Xin *et al*., 2007). En las superficies mucosas, IL-4 interviene en la producción de mucus y diferenciación de linfocitos B (Davey *et al*., 2000).

La IL-4 es una citoquina altamente pleiotrópica cuya producción temprana lleva a la diferenciación hacia células Th2, las que la producen de manera autocrina favoreciendo su propia diferenciación. Su producción inhibe la diferenciación de las células Th1 al regular de manera negativa la producción de IL-12 a partir de macrófagos. Asimismo, sirve como mediador del reclutamiento y activación de mastocitos y estimula la producción de Inmunoglobulina E (IgE) vía diferenciación de linfocitos B hacia plasmocitos productores de IgE. Se ha demostrado que es capaz de bloquear o suprimir a las citoquinas derivadas de macrófagos como IL- 1, TNF-α, IL-6 e IL-8, suprime también la actividad citotóxica de los macrófagos, muerte de parásitos intracelulares, y producción de óxido nítrico. Desde el punto de vista infeccioso, aún no es clara su participación en la eliminación de patógenos, por el contrario, funciona como un factor de crecimiento para *Staphylococcus aureus* facilitando su diseminación sistémica. Por otro lado, afecta células estructurales promoviendo la proliferación del endotelio vascular y fibroblastos cutáneos, aunque disminuye la proliferación de astrocitos y músculo liso vascular. Adicionalmente, algunos estudios señalan una posible actividad anti tumoral (cáncer pulmonar) con carácter dosis dependiente (Berin *et al*., 1999; Opal y De Palo, 2000).

Otra función importante es la activación de macrófagos al inducirlos al estado “M2” conocido como el fenotipo activado. Esta actividad refleja el carácter contradictorio de la citoquina, dependiente de dosis, tiempo y célula blanco (Koller *et al*., 2010).

La señal instructiva de IL-4 induce la diferenciación de linfocitos Th vírgenes activados hacia células Th2 expresando IL-4, IL-5 e IL-13. Participa directamente sobre la regulación de los linfocitos Th2 al ligarse a un elemento

del intrón 1 del gen IL-4, proceso que resulta crucial para el mantenimiento de la memoria. Este elemento (CIRE) consta de una región dentro del exón 1 de 17pb de longitud bien conservados entre los mamíferos, esta secuencia corta contiene 2 sitios de unión a GATA-3 (Tykocinski *et al*., 2005).

Su señalización se realiza mediante la unión de IL4 a la cadena α de su receptor (IL4R α) y su consecuente dimerización con la cadena gamma común (complejo tipo I) o con la cadena IL13Rα1 (complejo tipo II). Este último es idéntico al formado por IL13 y la cadena IL13Rα1 con subsecuente dimerización con IL4Rα, así que tanto IL4 como IL13 son ligandos para IL4R; aunque se ha sugerido que IL4 es el ligando de preferencia. Es de notar que IL4Rα promueve el crecimiento de tumores en ratones inoculados con agentes cancerígenos químicos, por lo que esta molécula pudiera ser considerada como blanco terapéutico (Koller *et al*., 2010).

La regulación de la transcripción sigue las vías NFAT y AP-1 a través de influjos de Ca^{2+} que modulan la fosforilación de estos factores de transcripción. Recientemente, se ha demostrado que ionóforos tipo ionomicina, que promueven el ingreso de Ca^{2+} intracelularmente, regulan la producción de citoquinas favoreciendo la producción de IL-4 a través de la defosforilación de NFAT, activación de ASK1 que lleva a la síntesis del factor p38 y la inducción de la síntesis de AP-1 (factor de transcripción), estando estos tres eventos íntimamente ligados. Asimismo, el factor de transcripción p38 estabiliza la vida media del ARNm de IL-4 (Guo *et al*., 2008).

Inicialmente, el IL-4R promueve el reclutamiento y fosforilación del factor STAT6, regulando finalmente la inducción de la transcripción del factor GATA-3. En ausencia de IL-4, GATA 3 es capaz de regular positivamente su propia expresión manteniendo la estabilidad de la respuesta Th2. El IFN-I (α/β) puede bloquear la expresión de GATA-3, desestabilizando el fenotipo Th2, lo que lo hace candidato como agente terapéutico en enfermedades de tipo alérgico; aunque tal función adicional para IFN I ha sido demostrada sólo en humanos (Huber *et al*., 2010).

Se han descrito polimorfismos en el gen codificante de IL4, como por ejemplo un SNP (*single nucleotide polimorphism*) en la posición 590 de la región promotora que se asocia a atopía, desórdenes alérgicos, condiciones inflamatorias y autoinmunes (Astermark *et al*., 2006).

Estudios en la línea celular derivada de enterocitos humanos (línea T84) inoculada con IL-4 exógena y suero de pacientes atópicos ha demostrado el traslado bidireccional de moléculas con tamaño y composición antigénica desde el borde apical hacia el borde basal entérico, con aumento de expresión de IL-4. Esta condición es un factor predisponente para la inflamación al permitir que antígenos luminales sean interiorizados y adquieran acceso al sistema inmune. Existe una asociación importante entre la expresión de esta citoquina y las alergias atópicas, tanto en humanos como en modelos animales. Otros efectos directos sobre la mucosa intestinal incluyen, además del aumento de permeabilidad apical-basal, reducción de respuestas secretoria iónica, disminución de la resistencia eléctrica, cambio de clase para favorecer la producción de IgE, estimulación de producción de otras citoquinas propias de la respuesta Th2, aumento de expresión ante la presencia de helmintos. (Berin *et al*., 1999).

Similarmente a lo que ocurre en vías respiratorias, esta citoquina ha de tener efecto sobre metaplasia de células Goblet e hipersecreción de mucus en el epitelio intestinal (Reader *et al*., 2003). La respuesta Th2 a través de la expresión de IL-4 parece tener un efecto protector contra infecciones entéricas por ETEC, tal vez debido a la necesidad de producción de IgA para eliminar tal infección e incluso es crucial para la resolución de la infección por *Giardia lamblia*. Sin embargo, la respuesta tipo Th1 es esencial para disminuir la carga de trofozoitos y quistes de este parásito a nivel intestinal (Long *et al*., 2010). Asimismo, se le ha involucrado con los mecanismos patogénicos del asma, alergias y atopias (Koller *et al*., 2010).

3.4.2.2. Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (CSIF sus siglas en inglés), tiene propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por linfocitos T y Macrófagos. Es producida por monocitos/macrófagos, linfocitos Th2 y linfocitos B, inhibe la producción de las citoquinas IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-8 e IL-12 de los monocitos/macrófagos y neutrófilos y la respuesta de los linfocitos Th1. Circula en forma de homodímero que consiste de dos proteínas de 160 aminoácidos. Inhibe la expresión de moléculas MHC-II, moléculas accesorias tipo B7 y la proteína CD14 en la superficie celular. También inhibe la síntesis de citoquinas en neutrófilos y células NK, inhibe la translocación nuclear del NF-κB y promueve la degradación del ARN mensajero (ARNm) de las citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, atenúa la expresión del receptor TNF y promueve su desprendimiento hacia la circulación. Puede medirse durante las infecciones sistémicas y en estados inflamatorios, por lo que su administración durante endotoxemias ha resultado en mejoramiento de la supervivencia en modelos animales gracias a menor efecto sistémico de las citoquinas (Opal y De Palo, 2000).

Tiene efecto inhibitorio autocrino sobre macrófagos y células dendríticas, limita las funciones innatas de estas células, impidiendo la activación subsecuente de células T. Por otro lado, aumenta la expresión de sí misma en células T reguladoras, promoviendo su propia síntesis en un sistema de retroalimentación positivo que limita la respuesta inmune. Dentro de los mecanismos de regulación destaca la participación de moléculas agonistas de TLR2 en células presentadoras de antígeno donde se encuentran PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patogenos), estas moléculas son cruciales para la síntesis de IL-2 en macrófagos y células dendríticas, aunque las células plasmacitoides no producen IL-10. Luego de que una molécula se ha ligado al TLR, es necesaria la participación de moléculas adaptadoras como MYD88 (MAPK y NFκB) y TRIF. Es de notar que la inducción óptima de IL-10 desde antígenos tipo LPS requieren la participación de ambas vías de señalización además de requerir moléculas accesorias como IFN I. Parte de su regulación

depende también de la expresión de IL-6 que induce la expresión de IL-21 y que finalmente de manera autocrina promueve la expresión de IL-10 según lo hallado en células dendríticas de médula ósea estimuladas con LPS in vitro (Maynard *et al*., 2009).

Su importancia en la resolución de cuadros entéricos sintómaticos causados por cepas *E. coli* EPEC es notoria debido a que disminuye los efectos destructivos de las citoquinas proinflamatorias, las que se encuentran elevadas en pacientes sintomáticos (Long *et al*., 2010). Actualmente, su uso viene siendo evaluado como terapia en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (Opal y De Palo, 2000).

Ratones deficientes de esta citoquina presentan colitis espontánea o inflamación intestinal crónica, la que es mediada por células T CD4+ y se asocia a respuestas Th1 incrementadas en la fase temprana de la enfermedad, mientras que las citoquinas de la respuesta Th2 aparecen tardíamente (Siegmund *et al*., 2004). Contrariamente, su deficiencia en modelos murinos infectados experimentalmente con *Mycobacterium avium* los capacita para controlar mejor la infección que su contraparte no manipulada. Lo contrario ocurre con ratones deficientes en IL4, que exhiben signos patológicos más graves que los animales normales (Coussens, 2004).

En los análisis filogenéticos efectuados sobre secuencias de llama y camello, se ha demostrado que la secuencia de ADNc de IL-10 se relaciona estrechamente con las secuencias del caballo (*Perissodactyla*), humano (primates), bovino (suborden *Ruminantia*) y porcino (suborden *Suiformes*) (Odbileg *et al*., 2006).

En infecciones naturales con *Brucella abortus* y *Brucella mellitensis*, se ha demostrado la elevación de los niveles de IL-10 en suero de dromedarios (*Camelus dromedarius*), esto probablemente se deba a un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que modula la transcripción y expresión de IL-

10 para suprimir la respuesta celular (Th1) contra esta bacteria (Erdogan *et al*., 2007).

En modelos humanos y murinos, se ha comprobado que existe diferencia en la producción de IL-10 entre el sexo masculino y femenino, siendo los machos los que expresan niveles más bajos de IL-10 mientras que las hembras tienden a mostrar mejor recuperación tras procesos inflamatorios (Asai *et al*., 2001).

Similarmente a lo observado con TGF-β, IL-10 también contribuye a la generación de células Treg, aunque en menor grado que TGF-β, como ha sido demostrado en cultivo celular de al menos 2 generaciones de estas células supresoras. La actividad de ambas citoquinas se ha evaluado a través de la cuantificación del ARNm y su adición en cultivos celulares donde su actividad puede ser bloqueada con anticuerpos monoclonales específicos. Esta nueva generación de células Treg implica la "educación" de células CD4+CD25- para que adquieran actividad supresora dependiente de IL10 y TGF-β, lo que representa un sistema de regulación de respuesta frente a autoantígenos o antígenos presentados por APC en mucosa intestinal (Zheng *et al*., 2004).

Aún más, forma parte de la firma citoquínica de las células T reg e incluso es característica de las células T reguladoras tipo 1 (Tr1, que no expresan Foxp3), aunque sólo las T reg residentes en mucosa intestinal son competentes para coexpresar IL-10 a manera de mecanismo de tolerancia periférica contra antígenos intestinales. Este sistema funcionaría a través de TLR's, limitando su respuesta contra antígenos de microorganismos comensales (Maynard *et al*., 2009).

Se han descrito varios polimorfismos para esta citoquina asociados a enfermedades de corte autoinmune en pacientes humanos, por ejemplo, una variante de 134pb de un microsatélite en la región promotora del gen IL10 que se asocia a concentraciones altas de inmunoglobulinas en enfermedades como lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, y granulomatosis de Wegener (Astermark *et al*., 2006).

Estudios hechos en humanos han demostrado que existe un origen genético para la producción aumentada de IL10 que es de carácter clínicamente significativo. Así, por ejemplo, se ha demostrado que existen diferencias marcadas entre individuos sanos para producir IL10 tras la estimulación con LPS y grupos familiares caracterizados por sobreproducir esta citoquina teniendo mayor probabilidad de sucumbir ante un episodio de enfermedad por meningococos. El origen genético de estas diferencias explica entre el 50 y el 70% de las variaciones inter individuo, en el caso de los humanos se han descrito 11 polimorfismos y dos microsatélites solamente en la región promotora del gen, lo que ha determinado la existencia de cuatro haplotipos comunes de IL10. Estas variaciones se han asociado a la presentación de enfermedades autoinmunes y la resolución de determinadas patologías, y se explican por variaciones alélicas y mecanismos regulatorios post transcripcionales (Kurreeman *et al*., 2004).

4. Neumonías producidas por *Pasteurella multocida*

Garmendia *et al* (1986) realizó un estudio sobre mortalidad en crías de alpacas en la sierra sur de nuestro país, encontró un alto porcentaje de mortandad de animales con bajos títulos de anticuerpos maternales, pero también llamo la atención que la mayoría de los animales muertos padecieron de procesos neumónicos o procesos mixtos (enteropatías y neumonías) seguido de procesos únicamente entéricos. La literatura nos indica que las neumonías tienden a ser la segunda causa de mortalidad en crías de alpacas, asociados generalmente a procesos bacterianos y víricos, mayoritariamente asociados entre ellos, y por lo general *Pasteurella multocida* se encuentra en la mayoría de procesos neumónicos fatales (Garmendia *et al*., 1986; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2001; Rosadio *et al*., 2011).

Cirilo *et al*., (2012) determinaron que las neumonías agudas en alpacas son consecuencia, muy similar a lo que ocurren en rumiantes, de múltiples agentes, en mayor proporción formado por asociaciones entre virus (Virus respiratorio sincitial y Parainfluenza tipo 3) con *Pasteurella multocida* y *Mannheimia hemolytica*.

Por otro lado, otro estudio reveló mediante aislamientos bacterianos que *P. multocida* se presenta con mayor frecuencia que *Mannheimia haemolytica* en procesos neumónicos fatales, muy similar a lo mostrado anteriormente por Ameghino y Calle (1989) considerando a *P.multocida* como la bacteria más predominante, estando presente en 11 crías de 26 de los animales en estudio. Otros estudios incluyen a *Mannheimia haemolytica* (antes *Pasteurella haemolytica*) como participante en estos procesos (Ameghino y De Martini, 1991), a su vez Rosadio *et al*., (1990) reportó la participación de *P. multocida* y *Mannheimia haemolytica* (antes *Pasteurella haemolytica*) en neumonías agudas en alpacas en el Perú, lo cual fue observado en otro estudio, donde crías post-destete sufrieron cuadros neumónicos asociados a *P. multocida* (Guzmán, 2011).

4.1. Pasteurella *multocida.*

Hace más de 125 años, Louis Pasteur identifico por primera vez el agente causante del Cólera Aviar que, de manera anecdótica, logró atenuar e inocular en aves para conferirles protección frente a la enfermedad (Harper *et al*., 2006).

A lo largo del tiempo esta bacteria tuvo diferentes denominaciones: *Micrococcus gallicidus* (Burril, 1883), *Bacterium bipolarmulticidum* (Kitt, 1893), *Bacterium septicaemia haemorrhagica* (Hueppe, 1886). Al final, al siguiente año, Trevisan (1887) propuso el nombre *Pasteurella* en conmemoración a los trabajos realizados por Louis Pasteur sobre este organismo. Lignieres propuso una clasificación de las pasteurelas en función del hospedador (*P. avicida, P. bovicida, P. boviseptica*) (Ligniéres, 1990). Más tarde se agruparon diferentes bacterias que presentaban características morfológicas y bioquímicas similares en *P. séptica* (Topley y Wilson, 1929). El nombre definitivo de *P. multocida* fue asignado por Rosenbusch y Merchant en 1939 (Weber *et al*., 1984).

4.1.1. Taxonomía y Filogenia

P. multocida pertenece al orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae* y género *Pasteurella*. La familia *Pasteurellaceae* es conocido como una familia muy heterogénea, que se ha sometido a múltiples reclasificaciones y sobre la

que, todavía, se continúan cuestionando sus relaciones taxonómicas. Actualmente comprende 13 géneros según la "Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature": *Actinobacillus, Aggregatibacter, Avibacterium, Bibersteinia, Gallibacterium, Haemophilus, Histophilus, Lonepinella, Mannheimia, Nicoletella, Pasteurella, Phocoenobacter y Volucribacter* (Pohl, 1981; Olsen *et al*., 2005). *Pasteurella* es el género tipo de esta familia, y *P. multocida* a su vez la especie tipo de este Género (Trevisan, 1887; Lehmann y Neumann, 1899; Rosenbusch y Merchant, 1939; Mannheim y Carter, 1984). La organización de esta familia ha sido establecida por comparaciones fenotípicas (Kilian y Frederiksen, 1981), así como mediante análisis de hibridación ADN-ADN (Mannheim *et al*., 1980; Svoboda *et al*., 1981; Mannheim, 1983; Christensen y Bispoard., 2000), hibridación ARNr-ADN (De Ley *et al*., 1990) y análisis de secuencias del gen que codifica el gen del ARNr 16S (Chuba *et al*., 1988; Dewhirst *et al*., 1992), entre otros métodos taxonómicos.

Mutters *et al*. (1985a) reclasificaron el género *Pasteurella* Trevisan 1887 en base a estudios de hibridación de ADN-ADN. Se definieron entonces once especies: *P. multocida, P. canis, P. stomatis, P. dagmatis, P. anatis, P. langaa, P. gallinarum, P. volantinum, P. avium, Pasteurella sp.* A *y Pasteurella sp*. B. Además *P. multocida* fue subdividida a su vez en tres subespecies: multocida, septica y gallicida (Mutters *et al*., 1985a). Posteriormente se ha ido incluyendo nuevas especies dentro del género *Pasteurella* y reclasificando algunas de las antiguas, comprendiendo actualmente 22 especies (Cuadro 1).

Cuadro 1**.** Especies del genero *Pasteurella*, derivado de García (2010).

Especie	Referencia	Reclasificación	Referencia
P. aerogenes	McAllister y Carter, 1974; Skerman *et al*., 1980; Christensen *et al*., 2005		
P. anatis	Mutters *et al*., 1985a	*Gallibacterium anatis*	Christensen *et al*., 2003
P. avium	Mutters *et al*., 1985b	*Avibacterium avium*	Blackall *et al*., 2005
P. bettyae	Sneath y Stevens, 1990; Sneath, 1992		
P. caballi	Schlater *et al*., 1989		
P. canis	Mutters *et al*., 1985a		
P. dagmatis	Mutters *et al*., 1985a		
P. gallinarum	Hall *et al*., 1955; Skerman *et al*., 1980	*Avibacterium gallinarum*	Blackall *et al*., 2005
P. granulomatis	Ribeiro *et al*., 1989	*Mannheimia granulomatois*	Angen *et al*., 1999
P. haemolytica	Newsome y Croos, 1932; Skerman *et al*., 1980	*Mannheimia haemolytica*	Angen *et al*., 1999
P. langaaensis	Mutters *et al*., 1985a; Trüper y De´Clari, 1998		
P. lymphangitidis	Sneath y Stevens, 1990	*Yersinia pseudotuberculosis*	Gaillot *et al.,*2013
P. mairii	Sneath y Stevens, 1990; Sneath, 1992; Christensen *et al*., 2005		
P. multocida	Lehmann y Neumann, 1899; Rosenbusch y Merchant, 1939; Skerman *et al*., 1980; Mutters *et al*., 1985a		
P. pneumotrpica	Jawetz, 1950; Skerman *et al*., 1980		
P. oralis	Christensen *et al.,* 2012		
P. skyensis	Birkbeck *et al*., 2002		
P. stomatis	Mutters *et al*., 1985a		
P. testudinis	Snipes y Biberstein, 1982		
P. trehalosi	Sneath y Stevens, 1990	*Bibersteinia trehalosi*	Blackall *et al*., 2007
P. ureae	Jones, 1962; Skerman *et al*., 1980	*Actinobacillus ureae*	Mutters *et al*., 1986
P. volantium	Mutters *et al*., 1985a	*Avibacterium volantium*	Blackall *et al*., 2005

Basándose en la comparación de secuencias del gen que codifica ARNr 16S, el género se divide, además, en dos grupos filogenéticos que presentan una asociación con el origen animal, básicamente en función de si el hospedador es mamífero o aviar (Dewhirst *et al*., 1992; Dewhirst *et al*., 1993).

P. multocida es una especie bacteriana muy heterogénea, en la que se han descrito multitud de variantes fenotípicas en relación a pruebas claves para su clasificación, tales como la ornitina decarboxilasa (ODC), indol, sacarosa, manitol y maltosa (Heddleston, 1976; Petersen *et al*., 1998; Christensen *et al*., 2004a; Christensen *et al*., 2005), lo que implica que este organismo no sea fácil de identificar ni clasificar. Además, las cepas encuadradas en esta especie presentan una enorme variación respecto a la morfología de las colonias y especificidad de antígenos (Carter, 1967; Boyce *et al*., 2004).

La relación y separación de las tres subespecies de *P. multocida* es también un tema de frecuente discusión. Se han utilizado diferentes métodos genotípicos para establecer las relaciones filogenéticas entre las tres subespecies, incluyendo hibridaciones ARNr-ADN, comparación de secuencias del gen que codifica el gen del ARNr 16S y de genes *housekeeping*, como el *atpD*, *rpoB e infB*, ribotipado etc. Generalmente se indica una gran homología entre ellas (Kuhnert *et al*., 2000; Petersen *et al*., 2001; Christensen *et al*., 2005; Kuhnert y Korczak, 2006). Fenotípicamente las tres subespecies se distinguen, principalmente, en función de diferentes patrones de utilización del sorbitol y del dulcitol (Mutters *et al*., 1985a). En el año 2002 se descubrió otra subespecie denominado tigris, con lo que conformarían 4 subespecies de *P. multocida* (Harper *et al.* 2006).

Cuadro 2: Subespecies de *P. multocida*, derivado de García (2010).

Subespecie	**Dulcitol**	**Sorbitol**
P. multocida. subsp. multocida	-	+
P. multocida. subsp. septica	-	-
P. multocida. subsp. gallicida	+	+

La subespecie *multocida* es la más frecuente y tiene una amplia gama de hospedadores, en cambio las subespecies *gallicida* y *septica* son mucho menos habituales. La subespecie *multocida* es la más común en ganado porcino (Blackall et al., 1997; Blackall *et al*., 2000; Bowles *et al*., 2000), además de ganado bovino (Bisgaard *et al*., 1991a), aves y gatos (Snipes *et al*., 1990; Korbel *et al*., 1992; Christiansen *et al*., 1992; Mohan *et al*., 1994; Dziva *et al*., 2001; Pedersen *et al*., 2003) y perros (Muhairwa *et al*., 2001).

La subespecie *septica* es aislada normalmente en aves (especialmente en salvajes), perros y, sobre todo, en gatos (Snipes *et al*., 1990; Biberstein *et al*., 1991; Korbel *et al*., 1992; Dziva *et al*., 2001; Petersen *et al*., 2001; Muhairwa *et al*., 2001). En gatos se demostró una afinidad especial por el sistema nervioso central (Biberstein *et al*., 1991). En ganado vacuno los datos de aislamiento de esta subespecie son escasos y están asociados a la presentación de septicemia hemorrágica (Biberstein *et al*., 1991; Bisgaard *et al*., 1991a; Bisgaard *et al*., 1991b), y más aún lo es en el caso del ganado porcino, donde produce la rinitis atrófica (Varga *et al*., 2007). En humanos esta subespecie se asocia frecuentemente a infecciones de heridas o mordiscos producidos por perros o gatos, mientras que la subespecie *multocida* se asocia más frecuentemente a procesos respiratorios (Chen *et al*., 2002).

Por último, la subespecie *gallicida* es la menos común de las tres, y es típica de muestras procedentes de aves, especialmente acuáticas y salvajes (Hirsh *et al*., 1990; Snipes *et al*., 1990; Fegan *et al*., 1995; Muhairwa *et al*., 2001).

4.2. Características generales.

Las especies de *Pasteurella* son identificadas como bacilos, gramnegativos, aeróbicos, no motiles, con ausencia de crecimiento en agar MacConkey, ureasa negativo, indol positivo, nitrato positivo, y ornitina descarboxilasa positivo, y producen ácido de glucosa, ribosa y sorbitol, pero no de xilosa, maltosa, lactosa, manitol, sucrosa, dulcitol, trialosa o arabinosa. (Capitini et *al*., 2002; Rimler y Glisson, 1997). Es una bacteria oxidasa positivo, no hemolítica y

salvo excepciones, requiere factor V de crecimiento (Krause *et al*., 1987; Sneath y Stevens, 1990).

En agar sangre las colonias que crecen son pequeñas, circulares y convexas, su tamaño varía de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente de aspecto mucoso, grisáceo o blanquecino y de olor sui generis (como consecuencia de la producción de indol) (Rimler y Glison, 1997; Koneman *et al*., 1999).



Figura 1. *P. multocida* en placa de agar sangre (foto propia del estudio).

La subespecie *multocida* puede ocasionar procesos patológicos en una amplia gama de especies animales, muchos de ellos de gran impacto económico. En estas se incluyen al Colera Aviar, Septicemia Hemorrágica, Neumonía enzootica y rinitis atrófica porcina (Harper *et al*., 2006).

Las Cepas de *P. multocida* clásicamente se han diferenciado utilizando técnicas serológicas. Las cepas se pueden clasificar en cinco serogrupos (A, B, D, E y F) basados en sus diferentes antígenos capsulares, para determinar el serogrupo se viene utilizando una prueba de hemaglutinación indirecta. Además se clasifican en 16 serovares (serotipos) somáticos basados

principalmente por los antigenos lipopolisacáridos (LPS) utilizando la prueba de difusión en gel de precipitina de Heddleston. Ambos se han usado ampliamente en el diagnóstico de las enfermedades anteriormente mencionadas. Los aislamientos son comúnmente asignados una designación combinada como A:1 (capsular del serogrupo A y LPS serotipo 1) o B:2 (capsular del serogrupo B y LPS serotipo 2). (Carter, 1955; Heddleston *et al*., 1972; Harper et *al*., 2006).

Un estudio en el 2014 diseñó una PCR multiple para diferenciar las cepas de *P. multocida* en base al genotipo de LPS. La LPS-mPCR final era capaz de escribir de forma inequívoca 16 cepas de tipo Heddleston y 57 de 58 aislamientos de campo. Durante la prueba de la LPS-mPCR para la diferenciación de aislamientos de *P. multocida*, se utilizó el análisis de espectrometría de masas como la prueba de oro para evaluar la composición de los LPS producidas por cepas individuales. Este método de análisis de LPS identifica el tipo de azúcar y el contenido total de azúcar que luego se compara con las composiciones de LPS de las estructuras de Heddleston para predecir las glicoformas LPS expresadas por cualquier cepa particular (Harper *et al.*, 2015).

4.3. Epidemiología

El desarrollo de la neumonía causada por *P. multocida* es asociada con factores medio ambientales (lluvias, frío) y de estrés tales como hacinamiento, crianza mixta, transporte y otros, así como las infecciones bacterianas y virales concurrentes o predisponentes. Las lesiones pulmonares consisten en bronconeumonía aguda o subaguda que podría estar o no asociada a pleuritis. (Dabo *et al*., 2008).

P. multocida serogrupo A, está asociada a procesos neumónicos agudos en terneros, generando la enfermedad clínica y lesiones pulmonares menos severas que *M. haemolytica*. Como se comprobó en el estudio de 27 pulmones neumónicos de terneros de 1 a 4 semanas de edad, se obtuvieron 27 cepas de *P. multocida* (19.6%), la totalidad de estas pertenecieron al serogrupo A (Jaramillo *et al*., 1987); en otro estudio más reciente de 57 muestras

patológicas pulmonares de becerras, se aisló *P. multocida* en 21 animales, siendo todas las cepas clasificadas en el serogrupo A (Piojan *et al*., 1999). *Pasteurella* spp. forma parte de su flora nasofaríngea normal, pero debido a las condiciones de estrés y otras enfermedades concurrentes (infecciones virales, etc.) facilitan la proliferación de *Pasteurella* spp. en la nasofaringe, ocurriendo entonces inhalación de microgotas conteniendo bacterias, las cuales se depositan en los alvéolos. Los animales en buen estado de salud fagocitan eficientemente *Pasteurella* sp. pero aquellos animales enfermos o bajo condiciones de estrés, pueden desarrollar neumonía (Yates, 1982).

En alpacas, Cirilo *et al.* (2012) encontraron en diferentes casos de neumonías fatales asociaciones entre diferentes agentes (Virus y Bacterias) como causantes de estos procesos, siendo *P. multocida* la bacteria más aislada en estos casos. Muchos casos de neumonías asociado a P. multocida se generarían en crías durante la época de parición, esto también es posible en animales de mayor edad debido al estrés producido por el destete y la esquila (Rosadio *et al*., 1990; Cirilo *et al.,* 2012; Guzmán *et al*., 2013).

4.4. Factores de Virulencia

P. multocida forma parte de la microbiota normal del tracto respiratorio de muchos animales, pero debido a condiciones medioambientales, estrés y coinfecciones con otros agentes patológicos, dan el ambiente idóneo para la proliferación de *P. multocida* en el tracto respiratorio. Luego por acción mecánica es inhalado hacia el tracto respiratorio inferior, depositándose en los alvéolos. (Yates, 1982). Para poder establecerse es necesario diferentes factores de virulencia.

4.4.1. Cápsula.

P. multocida es clasificado por sus antígenos capsulares denominados A, B, D, E y F. En general, las cepas que poseen una cápsula son más virulentas que las variantes acapsulares (Heddleston *et al*., 1972; Harper et *al*., 2006, Harper *et al*., 2015).

El importante papel de la cápsula en la patogénesis de *P. multocida* se ha demostrado claramente como genéticamente definido, mutantes acapsulares construidos a partir de ambas cepas de los serogrupos A y B fueron fuertemente atenuadas en ratones (Boyce y Adler, 2000; Chung *et al*., 2001). El serogrupo A sin cápsula mutante también demostró ser avirulento en pollos y no pudo establecer el crecimiento en el músculo de pollo (Chung *et al*., 2001). Curiosamente, a pesar de su aparente falta de persistencia, la vacunación de pollos con altas dosis de este mutante sin cápsula estimula la inmunidad protectora (Chung *et al*., 2005).

Es ampliamente aceptado que la cápsula tiene un papel importante en la resistencia a la fagocitosis, y esto ha sido demostrado *in vitro* por Harmon *et al*. (1991) y otros, que correlacionaron sensibilidad a la fagocitosis con la presencia y el grosor de la cápsula (Truscott y Hirsh, 1988; Harmon *et al*, 1991; Pruimboom *et al*., 1996). Por otro lado, estudios que utilizan los macrófagos murinos demostraron claramente que un mutante sin cápsula del serotipo B era más susceptible a la absorción que una cepa padre tipo salvaje (Boyce y Adler, 2000). La resistencia a la lisis mediada por el complemento es claramente importante para la virulencia, y los experimentos con cepas tipo A de *P. multocida* han demostrado que la resistencia en suero se correlaciona con la posesión de una cápsula (Snipes y Hirsh, 1986; Hansen y Hirsh, 1989). Un mutante sin cápsula ya no era suero resistente al suero aviar normal en comparación con el serotipo A de tipo salvaje (Chung *et al*., 2001). En contraste, un mutante sin cápsula de una cepa de serotipo B no mostró ninguna reducción de la resistencia en suero de bovino o murino en comparación con la cepa parental (Boyce y Adler, 2000). A pesar de esta evidencia sugiere que no hay pérdida de la resistencia sérica, el mutante sin cápsula del serotipo B fue fuertemente atenuado en ratones y la sensibilidad a la fagocitosis por macrófagos murinos aumentó (Boyce y Adler, 2000).

4.4.2. Lipopolisacárido.

El lipopolisacárido (LPS) es un componente integral de la membrana externa de bacterias gran negativas, juega un papel crítico en la patogénesis de la

enfermedad ya que interactúa directamente con las defensas de la inmunidad innata del hospedero como péptidos antimicrobiales y componentes del complemento (Harper *et al*., 2011).

Los anticuerpos monoclonales generados contra el LPS de un serotipo A fueron desafiados en ratones con bactericidas y protegidos contra la estimulación homóloga (Wijewardana *et al*., 1990). Además, un anticuerpo monoclonal de opsonización contra lipopolisacárido de una cepa del serotipo B de *P. multocida* a los ratones deja parcialmente protegido contra la infección por *P. multocida* (Ramdani y Adler, 1991).

Hay informes contradictorios en cuanto a las propiedades del LPS endotóxico aislados de *P. multocida*. La inoculación intravenosa del LPS del serotipo B: 2 podría reproducir los signos clínicos de septicemia hemorrágica en Búfalo, pero las propiedades del LPS endotóxico de cepas de serotipo A es menos clara (Horadagoda et al., 2002). Los estudios han indicado que los embriones de pollo y los ratones son muy susceptibles, pero los pavipollos son relativamente resistentes (Ganfield *et al*, 1976; Rhoades y Rimler, 1984; Mendes *et al*., 1994).

Está claro qué *P. multocida* requiere una estructura de lipopolisacárido completa con el fin de replicar *in vivo* y causar la enfermedad. En un estudio usando mutagénesis *signature-tagged*, un mutante atenuado en ratones y pollos tenía una inactivación por inserción del gen *waaQ*PM (que codifica un heptosyl transferasa putativo) requerido para la adición de heptosa al LPS (Harper *et al*., 2004). Usando espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear, se demostró que las glicoformas predominantes del LPS extraídos de este mutante fueron severamente truncadas. Experimentos de complementación demostraron que el suministro de un gen *waaQ*$_{PM}$ funcional en trans restaura tanto la estructura de LPS y el crecimiento en niveles de ratones de tipo salvaje (Harper *et al*., 2004).

Un mutante *galE* de *P. multocida* expresó una significativa reducción en su virulencia en ratones (Fernández de Henestrosa *et al*., 1997). El papel de *galE*

en bacterias es la epimerización de UDP-glucosa a UDP-galactosa antes del ensamblaje del lipopolisacárido, y este mutante probablemente expresó un LPS alterado, aunque no se informó el análisis estructural del LPS (Fernández de Henestrosa *et al*., 1997).

El análisis de la genética y la estructura de LPS en *P. multocida* muestran que cepas con la misma designación serológica pueden producir LPS estructuralmente distintos. Estos análisis también mostraron que los LPS producidas por otras cepas de *P. multocida* son estructuras truncadas de LPS y que no significa mayor diversidad de LPS en el campo, actualmente representado por las cepas del tipo 16 (Harper *et al*., 2015).

Una comparación de la composición de LPS, serotipificación Heddleston y tipificación por LPS-mPCR mostró claramente que la designación de serovares Heddleston falló con frecuencia para correlacionar con la composición de los LPS producidas por cada cepa. Por el contrario, el ensayo LPS-mPCR, específico para la identificación del *loci* para la biosíntesis del núcleo externo del LPS, siempre se correlacionó con la composición de LPS. El conocimiento del genotipo LPS permite la identificación del tipo de LPS y la posible gama de estructuras LPS que las cepas pueden producir. Sin embargo, el LPS-mPCR no puede predecir las estructuras LPS precisas producidas por cepas individuales debido a las mutaciones al azar dentro del *locus* LPS que a menudo conducen a cambios en su estructura (Harper *et al*., 2015).

4.4.3. Fimbrias y Adhesinas.

Las fimbrias desempeñan un probable papel en la adhesión a la superficie, estas se han observado que en algunas de cepas de *P. multocida* serotipo A, las cuales fueron capaces de adherirse a la mucosa del epitelio (Glorioso *et al*., 1982; Rebers *et al*., 1988; Isaacson y Trigo, 1995; Ruffolo *et al*., 1997).

Las fimbrias de tipo IV (pili) se han aislado y caracterizado de serotipos A, B y D de *P. multocida* (Ruffolo *et al*., 1997) y con frecuencia están asociados con la virulencia de otras bacterias debido a su papel en el establecimiento en las superficies de las células hospedadoras. El gen de la subunidad, *ptfa*, ha sido

aislado y secuenciado a partir de un número de cepas y las secuencias de proteínas predichas mostró una variación significativa entre las cepas (Doughty *et al*., 2000). Sin embargo, el papel de las estructuras fimbriales en la virulencia de *P*. *multocida* no está probada.

Muchos genes, incluyendo *ptfa*, *fimA*, *flp1*, *flp2*, *hsf*_1 y hsf_*2* en el genoma de *P. multocida* codifican proteínas similares a las fimbrias o fibrillas en otras bacterias. El genoma de *P. multocida* Pm70 contiene una región que codifica las proteínas con similitud significativa con el *locus* de la pilina Flp en *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que codifica una subfamilia fimbrial tipo IV descrito recientemente (Kachlany *et al*, 2001b; May *et al*, 2001). Este *locus* codifica proteínas que provee subunidades de la pilina Flp y las proteínas necesarias para su montaje. A pesar de la falta de evidencia física para el pili Flp en *P. multocida*, hay evidencia a través de estudios en ratones que son necesarios los productos de estos genes en la virulencia. Dos genes, *flp1*, que codifica una subunidad de la pilina Flp y *tadD*, que codifica un componente del aparato de secreción necesarios para el montaje de la pilina Flp, han sido inactivados en dos estudios STM independientes usando mutagénesis de transposón, y ambos mutantes fueron significativamente atenuados en ratones (Fuller *et al*., 2000; May *et al*., 2001; Kachlany *et al*, 2001a, b; Harper *et al*, 2003).

Dos genes de *P. multocida*, *pfhaB1* y *pfhaB2*, comparten una similitud significativa con una clase de genes que codifican hemaglutininas filamentosas, que en *Bordetella pertussis* juegan un rol importante en la colonización del tracto respiratorio superior (Kimura *et al*., 1990; Mooi *et al*., 1992). La mutación de estos genes en *P. multocida* resultó en una significativa reducción de la virulencia en ratones (Fuller *et al*., 2000). Más recientemente, una proteína mutante pfhaB2 se construyó a partir de una cepa de cólera aviar, P1059, y demostró estar altamente atenuado en pavos cuando se administró por vía intranasal, pero sólo moderadamente atenuada cuando se administró por vía intravenosa, lo que sugiere que pfhaB2 tiene un papel importante en la colonización inicial o invasión (Tatum *et al*., 2005).

4.4.4. Toxinas

En general, la mayoría de las cepas de *P. multocida* que causan el cólera aviar, la septicemia hemorrágica o neumonía no se conoce que expresen toxinas. La toxina dermonecrotica (PMT), principalmente expresada por cepas del serogrupo D, es la única toxina identificado hasta la fecha y es responsable de los signos clínicos y patológicos de la rinitis atrófica (Foged *et al*, 1987; Rimler y Rhoades, 1984). Tanto la toxina PMT nativa y recombinante purificada se puede utilizar para inducir experimentalmente signos clínicos de enfermedad (Foged *et al*., 1987; Lax y Chanter, 1990).

La PMT actúa intracelularmente mediante la modulación de la subunidad $G\alpha_q$ en la vía de transducción de señales de la fosfolipasa C (Murphy & Rozengurt, 1992; Wilson *et al*., 1997). En los cerdos, esto conduce a la atrofia de los cornetes nasales donde se produce la resorción ósea debido a la proliferación incontrolada de los osteoclastos, y la regeneración de hueso se evita mediante la inhibición de los osteoblastos (Sterner-Kock *et al*., 1995; Mullan y Lax, 1998). La PMT también es un potente mitógeno, induciendo muchos efectos celulares incluyendo reordenamientos en el citoesqueleto de actina (Zywietz *et al*., 2001). Como las toxinas del cólera y la tos ferina, la PMT activa las células dendríticas a células maduras, pero, a diferencia de las otras toxinas, es un adyuvante pobre y parece suprimir la respuesta de anticuerpos (Bagley *et al*., 2005). Se ha propuesto la PMT induce migración de células dendríticas a los ganglios linfáticos regionales y pueden, por lo tanto, en una infección natural, limitar el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (Blocker *et al*., 2006).

El gen de la toxina PMT reside en un bacteriófago lisogénico perteneciente a la Familia *Siphoviridae*. Como la toxina PMT no tiene ninguna secuencia señal y mecanismo conocido de exportación, se ha sugerido que la fase lítica de los bacteriófagos puede mediar en la liberación de la toxina (Pullinger *et al*., 2004). La toxina es un inmunógeno eficaz. Se encontró un toxoide desarrollado mediante mutagénesis por deleción del gen de la toxina PMT clonado para proteger a los ratones y su descendencia contra el desafío frente la PMT

purificada (Petersen *et al*., 1991). Del mismo modo, una toxina PMT modificada genéticamente, donde había dos sustituciones de aminoácidos claves, dio lugar a una proteína no toxigénica que protegía los cerdos frente a la exposición experimental con la cepa de tipo salvaje (To *et al*., 2005).

4.4.5. Proteínas de adquisición y regulación de hierro.

El hierro es un elemento esencial que debe ser adquirido por las bacterias para sobrevivir. Debido a su toxicidad inherente, el nivel de hierro libre disponible *in vivo* es muy limitada y *P. multocida*, como otras especies bacterianas, ha desarrollado múltiples mecanismos para la absorción de hierro. Análisis de secuencias de *P. multocida* PM70 reveló que una proporción relativamente grande del genoma (más de 2,5%) codifica 53 proteínas con similitud a proteínas implicadas en la captación de hierro o adquisición (May *et al*., 2001).

Comparaciones de *P. multocida* crecida en medios ricos en hierro, medios con poca cantidad de hierro o *in vivo* demostraron que muchas proteínas de membrana externa de alto peso molecular están reguladas por los niveles de hierro y por lo tanto han sido llamados proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) (Snipes *et al*., 1988; Choi-Kim *et al*., 1991). *Pasteurella multocida* que crece en condiciones de hierro-limitado también induce una respuesta protectora más fuerte en ratones en comparación con la misma cepa cultivada en condiciones de abundante hierro (Kennett *et al*., 1993), y se piensa que los IROMPs pueden, por lo tanto, desempeñar un papel importante en la inmunidad de protección cruzada (Glisson *et al*, 1993; Ruffolo *et al*, 1998). Sin embargo, un enfoque en el análisis proteómico de los IROMPs ha identificado sólo una proteína, PM0805, que fue regulada hacia arriba y sólo uno, OmpW, que fue regulada hacia abajo en condiciones de bajo hierro (Boyce *et al*., 2006).

Un estudio sobre la capacidad inmunogénica del IROMP se realizó con el fin de usarlo con fines protectivos. Se extrajo proteínas de membrana externa de una cepa B:2 de *P. multocida* desafiándolos *in vivo* en ratones y midiendo

niveles de anticuerpos específicos. El resultado indica que el IROMP es un buen inmunógeno que provoca una respuesta de anticuerpos significativa, mostrando que la inoculación intranasal produjo una protección del 100% en ratones frente a la enfermedad (Kharb y Charan, 2010).

Las proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) de *Pasteurella multocida* A: 3 cepa 232 (Pm232), aislado de bovino, fueron investigados como inmunógenos potenciales en el ganado. Se abordó la capacidad de las fracciones IROMP-enriquecidas de *P. multocida* para inducir respuestas de anticuerpos en ganado por diferentes estrategias de vacunación y la eficacia protectora de estos anticuerpos utilizando un modelo de desafío de neumonía inducida por *P. multocida*. La vacunación del ganado con fracciones derivadas de membrana externa de Pm232 cultivadas en condiciones de hierro agotado (IROMPs) o en condiciones suficientes de hierro (OMP) inducen respuestas de anticuerpos significativas. Los análisis adicionales indicaron que la proteína HasR de Pm232 es una OMP expuesta a la superficie y conservada entre los aislados de *P. multocida* más investigados (Prado *et al*., 2005).

Curiosamente, la inmunidad protectora puede ser estimulada o bien con OmpH o en su ausencia. Extractos de membranas externas de un triple mutante *fur*-, *ompH1*-, *ompH*- fueron protectivos (Garrido *et al*., 2008), sin embargo, el número de animales era pequeño, por lo tanto, el análisis estadístico fue difícil. Una proteína recombinante OmpH también puede conferir protección homóloga (Lee *et al*, 2007; Sthitmatee *et al*., 2008). Estas observaciones de dos grupos independientes pueden estar relacionados con la ausencia del gen *fur*, lo que resulta en la sobre expresión de las proteínas OM regulados por la piel (IROMPs). Garrido *et al*. (2008) demostraron que un único mutante *fur*- no provocó ninguna protección. Sin embargo, es posible que la interrupción de ambos genes *ompH*, generen que otras proteínas se expresan a niveles elevados en la superficie bacteriana en cantidades suficientes para provocar una respuesta protectora. Por lo tanto, OmpH bien puede ser una de varias proteínas de protección (Hatfaludi *et al*., 2010).

Una proteína de 35 kDa regulada por el hierro de *P. haemolytica* la cual se cree que participa en la captación de hierro fue expresado *in vivo* y en medios de hierro limitante (Lainson *et al*., 1991). Otro miembro patógeno de *Pasteurellaceae*, *Haemophilus influenzae*, expresó una proteína periplásmica de fijación del hierro de 39 kDa que es homólogo a una proteína férrico de unión a hierro (37 kDa) de *Neisseria patógena* (Adhikari *et al*., 1995; Mietzner *et al*., 1986). Es posible especular que la OMP de 3,5 kDa de PBA100 y la OMP de 38 kDa de PBA101 pueden estar implicados en la absorción o transporte de hierro. Alternativamente, la inmunidad de protección cruzada observada puede no ser completamente una respuesta inmune humoral por lo que un papel de la inmunidad celular no es excluyente (Ruffolo *et al*., 1997).

En un estudio sobre el rol de la IROMP en la inmunidad se concluye que, una fracción proteica, PBA101 CDM -Fe, contenía antígenos que contribuyeron a la inmunidad de protección cruzada contra la pasteurelosis en ratones. Los anticuerpos dirigidos contra los FeOMPs, que participan en la absorción de hierro, pueden bloquear los receptores importantes y prevenir la absorción de hierro esencial, con necesidades de para el hierro las bacterias se convierten en no viables. Otros antígenos que pueden estar involucrados en la protección cruzada están siendo identificados, y la presencia de anticuerpos contra estos antígenos pueden tener un efecto aditivo sobre la protección cruzada (Rufollo *et al*., 1997). En consonancia con esta sugerencia, es probable que los FeOMPs de *P. multocida* no son los únicos factores de protección cruzados, sino que pertenece a un conjunto *in vivo* que expresa antígenos inmunodominantes que en conjunto proporcionan inmunidad de protección cruzada completa contra la pasteurelosis (Rufollo *et al*., 1997).

4.4.6. Hialuronidasas

Aunque el papel de hialuronidasa en la patogénesis no se ha determinado, está presente en muchas de las cepas del serotipo B de *P. multocida* que causan septicemia hemorrágica bovina. Un estudio de 74 cepas de *P. multocida* que representan todos los serotipos capsulares se encontró que sólo las cepas de tipo B, aisladas de infecciones de la septicemia hemorrágica,

producen hialuronidasa (Carter y Chengappa, 1980). Otro estudio de 176 cepas de *P. multocida* que representan diferentes serotipos también encontró actividad hialuronidasa limitada a serotipo B, pero más específicamente B:2, y se sugirió que una prueba para la actividad de la hialuronidasa se podría utilizar para identificar presuntamente B: 2 cepas (Rimler y Rhoades, 1994).

4.4.7. Proteínas de membrana externa

Los primeros estudios sobre la membrana externa de *P. multocida* demostraron que una proteína de 37 kDa estaba identificado entre cinco posibles inmunógenos protectores basados en primer lugar en los resultados de radioinmunoprecipitación utilizando sueros de protección inmune de conejo, y en segundo lugar en su ubicación en la membrana externa (Lu *et al*., 1988). Los anticuerpos monoclonales generados contra la proteína de 37 kDa fueron capaces de proteger pasivamente conejos y ratones contra la infección con *P. multocida* con fuerte protección otorgada contra cepas homólogas, y una protección limitada frente a las cepas heterólogas (Lu *et al*., 1991).

Estudios recientes que examinaron la capacidad de *P. multocida* para unirse a las proteínas de matriz extracelular del hospedero, demostraron que las bacterias pueden adherirse a la fibronectina y colágeno de tipo IX. Las proteínas identificadas como posibles adhesinas incluyen OmpA, Oma87, Pm1069 y las proteínas relacionadas con el hierro, Tbp (proteína de unión a transferrina) y el receptor putativo TonB: HgbA (Dabo *et al*., 2005).

OmpA, una proteína β-barril de canal iónico, se ha identificado específicamente de tener un papel directo en la adhesión. Los homólogos de esta proteína son adhesinas importantes de *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* y otras bacterias. Notablemente, una OmpA recombinante de *P. multocida* se une a las células de riñón bovino e interactúa con la matriz extracelular del anfitrión y moléculas de heparina de fibronectina (Dabo *et al*., 2005).

Se descubrió una OMP en Pasteurella multocida con homología a una proteína de adhesión P6 de Haemophilus influenzae (P6-like), esta proteína fue desafiada frente a diferentes cepas vacunales mostrando que esta proteína puede ser usada para inducir una respuesta imune protectiva en aves frente al cólera aviar (Kasten *et al*., 1995). Otro estudio indica que la P6-like induce a una mejor protección al inducir una respuesta significativa en producción de anticuerpos específicos, lo que lo hace un muy buen inmunógeno para ser usado en vacunas (Shivachandra *et al*., 2017).

5. REAL-TIME PCR (qPCR)

El ensayo de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real es una variante de la PCR convencional que usa moléculas fluorescentes para monitorear la producción de los productos de la amplificación durante cada ciclo de una reacción de PCR. Esto combina las etapas de amplificación y detección de ADN en un ensayo homogéneo evitando así la necesidad de un gel de electroforesis para detectar los productos de amplificación. El análisis de datos apropiados y/o el uso de químicos apropiados también eliminan la necesidad de usar *Southern Blotting* o secuenciación de ADN para la identificación del amplicón. Su simplicidad, especificidad y sensibilidad, junto con su potencial de alto rendimiento y la introducción continua de nuevos compuestos quimicos, instrumentación más fiable y protocolos mejorados, han hecho del Real-Time PCR la tecnología de referencia para la detección de ADN (Bustin, 2005).

La tecnología del qPCR se basa en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación de un ADN diana (Figura 2). En lugar de observar la cantidad de ADN diana acumulada después de un número fijo de ciclos, los ensayos en tiempo real determinan el punto en el tiempo durante el ciclo cuando se detecta primero la amplificación de un producto de PCR. Esto se determina mediante la identificación del ciclo en el cual la intensidad de emisión del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo. Ese número de ciclo se conoce como el ciclo umbral (Ct o Cq). El Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es

inversamente proporcional al número de copias de la diana. Por lo tanto cuanto mayor sea el número de copias de partida de la diana de ácido nucleico, se observa que cuanto antes un aumento significativo de la fluorescencia, y menor el Ct (Bustin, 2005).

Simplificando, qPCR se puede utilizar como un ensayo cualitativo. Sin embargo, ya que la producción de fluorescencia es lineal a la muestra de concentración a través de una gama muy amplia, esta correlación lineal entre el producto PCR y la intensidad de fluorescencia se puede utilizar para calcular la cantidad de molde presente en el comienzo de la reacción (Bustin, 2005).

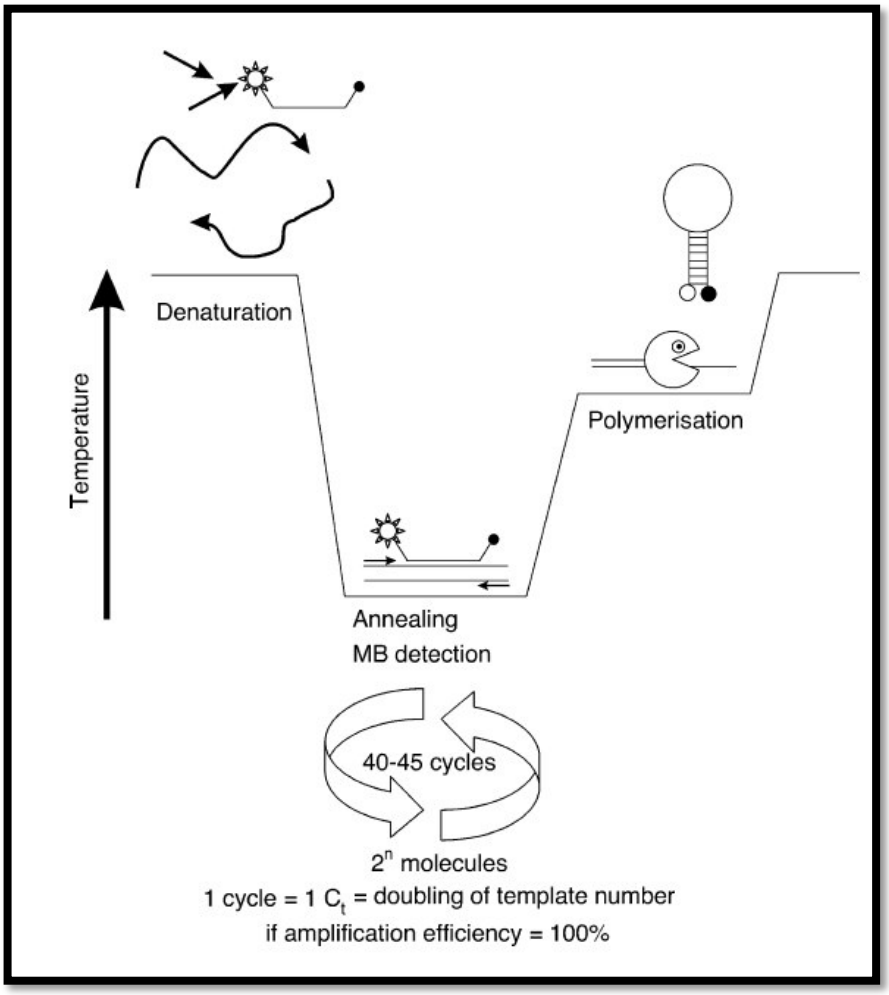


Figura 2. Representación esquemática de un ensayo de qPCR utilizando sondas Molecular Beacons (MB). En la temperatura de *annealing*, MB se une a su objetivo complementario y se toman lecturas de fluorescencia. En la temperatura de polimerización el MB se disocia de su objetivo para permitir a la Taq polimerasa leer y replicar el amplicón (Bustin, 2005).

5.1. Componentes

5.1.1. Templado o Molde (ADN o ADNc)

Se refiere a las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ADN realizado por la enzima polimerasa y que contiene la secuencia diana de interés (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

5.1.2. ADN polimerasa.

La función del ADN polimerasa es de catalizar la reacción que sintetiza nuevas cadenas de ADN que contienen la secuencia diana. En la actualidad, la enzima Taq ADN polimerasa, proveniente de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la de mayor uso a nivel mundial debido a su característica termoestable (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

5.1.3. Cebadores o *primers*

Los cebadores o "*primers*" son pequeñas secuencias de ADN (oligonucleótidos) que se utilizan para iniciar la síntesis de ADN. Un cebador contiene una secuencia de varía entre 15 a 25 nucleótidos de longitud. Se recomienda que la cantidad de guanina-citosina (G-C) no deba exceder del 55% de la secuencia. Generalmente para cada gen diana debe haber dos primers: *Forward* y *Reverse*; diseñadas para que hibriden con el ADN molde y luego intervenga la Taq Polimerasa para la síntesis de nuevas hebras moldes, siempre en dirección 5'-3' (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

5.1.4. Desoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTPs)

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

5.1.5. Fluoroforos con afinidad por el ADN

En qPCR se utilizan generalmente fluoróforos de unión al ADN no específico como es el SYBER Green, primers fluoroforoetiquetados como el LUX™ o sondas secuencia-específicos como el Scorpions™ (Bustin, 2005).

5.1.6. Solucion Buffer, Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y agua

La solución buffer generamente está compuesta por Tris-Hcl a un pH 8, el Cloruro de magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción y el agua es el disolvente de la reacción y debe ser ultrapura libre de nucleasas (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

En qPCR generalmente tenemos la solución buffer, el $MgCl_2$, los dNTPs y el fluoroforo en una sola solución, por lo cual solo se añaden los *primers*, agua ultra pura y el ADN molde.

5.2. Pasos de la qPCR.

5.2.1. Desnaturalización

Es el calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (30-120 segundos) a una temperatura comprendida entre 68 y 97°C, que debe ser superior a la de fusión (T_m: temperatura donde el 50% de los moldes de ADN están denaturados) de la región de ADN que quiere amplificarse (Herráez, 2012).

5.2.2. Hibridación o *Annealing*

Enfriamiento rápido por debajo de la T_m de forma que permite el emparejamiento del ADN monocatenario de interés con los primers. En general se usan temperaturas comprendidas entre 37 y 65°C que se mantienen entre 10 y 120 segundos (Herráez, 2012).

5.2.3. Extensión, elongación o replicación

Etapa de amplificación propiamente dicha (72-75°C, 1-3 min), en la que el ADN polimerasa termoestable elonga los *primers*, empleando como molde ambas hebras originales. El proceso transcurre en dirección 5'-3' a partir del extremo 3'-OH de cada primer, empleando como sustrato los cuatro dNTP, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se eleve la temperatura en una nueva etapa de desnaturalización (siguiente ciclo) (Herráez, 2012).

Además de las tres etapas de cada ciclo, suelen añadirse una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, a elevada temperatura (incluso superior a la de las etapas de desnaturalización, sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas (ADN genómico completo). La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos (Herráez, 2012).

5.3. Cuantificación relativa

La prueba de PCR en tiempo real, es una poderosa herramienta para cuantificar la expresión de genes (Livak y Schmittgen, 2001). La elección del método de cuantificación depende de la secuencia blanco a analizar, el rango de cantidades esperadas de ARN mensajeros en la muestra de tejido, y si la cuantificación es relativa o absoluta. La cuantificación relativa se basa en la expresión relativa de un gen blanco en comparación a un gen de referencia, que suele ser un gen de expresión constante en los tejidos ("Housekeeping gene"). Para investigar los cambios fisiológicos en la expresión de un gen, la tasa de expresión relativa es adecuada para la mayoría de propósitos (Pfaffl M, 2001). La cuantificación absoluta, se basa en el análisis con una curva de calibración externa o interna, así la metodología debe ser altamente validada, y las eficiencias en la amplificación de ADNc de las muestras y de los estándares deben ser idénticos. Además, las curvas estándares tienen que ser exactamente cuantificados; exigencias no tan estrictas para el análisis de cuantificación relativa (Schmittgen y Livak, 2001).

La cuantificación relativa se basa en la comparación de los Cts (curvas de amplificación) de dos muestras, en las cuales se busca evaluar la eficacia de un tratamiento, estado sanitario, carga viral, etc. Además, se emplea un gen control interno, el cual posee expresión constitutiva en los diferentes tejidos, ya que participan en vías metabólicas indispensables para la célula u organismo evaluado; y cuya expresión no se ve afectado por variables externas. Los más

usados son: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), albumina, actina, tubulina, 18S rRNA (Pfaffl, 2001; Schmittgen y Livak, 2001).

III. HIPOTESIS

La proteína P6-like recombinante de *Pasteurella multocida* aislada en alpacas es un factor de virulencia inmunológicamente estimulante para ser considerado como potencial candidato vacunal contra la pasteurelosis en alpacas

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

6. Evaluar la actividad inmunogénica *in vitro* de la P6-like recombinante de *P. multocida* aislado de neumonías en alpacas.

Objetivos específicos

7. Evaluar citoquinas de la respuesta inmune celular *in vitro* de la P6-like recombinante.

8. Evaluar citoquinas de la respuesta inmune humoral *in vitro* de la P6-like recombinante.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución:

Los ensayos *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2. Descripción del material experimental y Ensayos

Para los ensayos experimentales se usó una proteína recombinante P6-like (proteína de membrana externa), la cual fue producida en el Laboratorio. La elección de esta proteína como candidato vacunal fue parte del desarrollo del proyecto Innovate Perú (FINCyT) Contrato N° 133-FINCyT-IB-2013, el cual busca realizar una vacuna de nueva generación para la prevención y control de las neumonías pasteurelósicas en alpacas. Previamente se aisló una *Pasteurella multocida de* casos neumónicos en crias de alpacas en la región Puno y se realizó la secuenciación de su genoma.

La secuencia de esta bacteria fue evaluada y comparada *in silico* con datos disponibles del genoma de *P. multocida* en el NCBI, VFDB (*Virulence Factors DataBase*), MvirDB (*Microbial Virulence DataBase*), Protegen; y usando diferentes softwares (Glimmer versión 3.02, CAP3, Transeq, BLAST versión 2.2.27, Psortb versión 3.02, SignalP versión 4.0, LipoP versión 1.0, TMHMM versión 2.0), identificándose diez candidatos para ser utilizados entre ellas el gen que codifica la P6-like. Mediante el uso de *primers* específicos (Cuadro 3) fue amplificada mediante PCR a partir de aislados de *P. multocida* procedentes de cuadros neumónicos en alpacas. Posteriormente, mediante el uso del Kit

Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen) se clonó y expresó en cepas de *E. coli* BL21™ especial para este tipo de técnicas. Por último, la proteína fue purificada mediante el Kit **ProBond™ Puryfication System** y conservada en refrigeración.

Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos de los *primers* para la P6-like

Sentido del primer	P6-like (*omp*16)	Referencia
Foward Primer 5' ->3'	CACCGTTGCTGGTTCTGTTGCTG	Diseñado a partir del genoma de Pasteurella multocida en alpacas
Reverse Primer 5' ->3'	GGTATGCTAACACAGCACGACGG	

3. Toma de muestra de sangre.

Las muestras de sangre para la extracción de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) fueron obtenidas de alpacas adultas (2-3 años de edad), hembras, raza huacaya procedentes del Laboratorio de reproducción de la FMV-UNMSM, donde se mantuvieron en corrales separados de otras especies, alimentados con heno y agua *ad libitum*, monitoreados y evaluados físicamente (temperatura, frecuenciacardica, etc.), considerándolas animales sanos. Se recolectaron 30ml de sangre periférica de una de estas alpacas en tubos Vacutainer con anticogulante (EDTA) mediante punción de la vena yugular.

4. Aislamiento de PBMC y preparación del cultivo celular primario

La sangre recolectada fue transportada al laboratorio para el aislamiento de PBMC. En primera instancia la sangre fue mezclada con PBS 1X pH 7.8 en una proporción de 1:1. Luego mediante centrifugación en gradiente de densidad, se usó el reactivo Ficoll-Paque (Sigma, St Louis, MO, USA), el cual se tomó un tuvo falcon de 50mL y se añadieron en primer lugar el reactivo Ficoll y luego la mezcla de PBS con sangre en una proporción de 3:4 respectivamente, virtiendo la sangre de manera cuidadosa para evitar mesclar el ficoll con la sangre. Se llevó a centrifugación a 1750 rpm por 40 minutos, luego se recogió la interfase entre el plasma y el ficoll ya que correspondían a los PBMC.

Se realizaron 2-3 lavados de las células con PBS 1X pH 7.8 (6 mL) mediante centrifugación y finalmente se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 con L-Glutamina (Sigma, St Louis, MO, USA), Cabe recalcar que fue necesario el conteo y uniformización de cada cultivo a una concentración de células por ml (cel/ml), por ello antes de trabajar con las células aisladas se tomaron 5µL del paquete celular y se mezclaron con 5µl de dilución de azul de tripam con PBS (1:9 respectivamente), los cuales se llevaron a una cámara de Neubauer a un aumento de 400X para el conteo respectivo y evaluar viabilidad celular, mostrando valores por encima del 95% de viabilidad. Se homogenizó la muestra a una concentración de $1x10^6$ células/mL diluyéndolo en RPMI 1640 con L-glutamina, adicionando 100IU/mL de penicilina (Sigma, St Louis, MO, USA) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma, St Louis, MO, USA) inactivado por calor. Uniformizado el cultivo se procedió a poner en una placa de poliestireno para cultivo celular de 24 pocillos unos 1200µL de cultivo celular final por pocillo una concentración de $1x10^6$ células/mL.

5. Desafío mediante el uso de la proteína recombinante P6-like.

Una vez preparado los cultivos celulares de PBMC se formaron 2 grupos: calibrador y desafío. El grupo calibrador estuvo conformado por tres muestras (pocillos con 1200 µL por muestra), no expuestas a ningún estimulo y evaluando su perfil citocinico a las 0h del experimento. El grupo desafío conformado por cultivos celulares (pocillos con 1200 µL por muestra) donde se inocularon 10 ηg de proteína recombinante P6-like, y evaluados las 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 y 72 horas post desafio. Es importante recalcar la concentración de células por cada pocillo ($1x10^6$ células/mL). Los tiempos de desafio fueron evaluados por triplicado, por lo que se evaluó el perfil de 24 muestras en total en el grupo desafío (tres muestras por tiempo). Estas muestras se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 38°C y con 5% de CO_2. Luego, se realizaron conteos celulares de cada muestra para corroborar la uniformidad del número de células en las muestras.

6. Extracción de ARN total

Se extrajo el ARN total mediante el uso del ***Kit RNeasy* de Qiagen** de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Se tomaron 1000 µL del cultivo celular (concentración: $1x10^6$ células/ml) y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante. Luego se adicionó 350 µL de buffer RLT y 3.5 µL de β-mercaptoetanol.

Se homogenizó mediante pipeteo durante unos 30 minutos, luego se adicionó 350 µL de Etanol al 70% y se volvió a homogenizar por inmersión durante 5 minutos y se dejo reposando por una hora. Se tomó hasta 700 µL de la muestra a una columna de *RNeasy*, cerrándola y centrifugándola por dos minutos a 10000 rpm a 4°C, desechándose el sobrenadante al final. Se adicionaron 700 µL de buffer RW1 y se volvió a centrifugar a la misma velocidad, temperatura y tiempo del paso anterior eliminando el sobrenadante al final. Luego se adicionó 500 µL de buffer RPE y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones.

Se repitió este último paso una vez más. Luego se colocaron las columnas de *RNeasy* en otro tubo de 1.5 mL y se añadieron 30 µL de agua ultrapura libre de nucleasas, se centrifugó a 10000rpm por un minuto a 4°C, se eliminó la columna de *RNeasy* y se procedió a guardar el tubo con la muestra a -80°C, hasta el momento de la evaluación mediante PCR en Tiempo Real (qPCR).

Previo a la evaluación se procedió a cuantificar la concentración de ARNm en cada muestra mediante el kit de cuantificación QUANT-IT RNA BR ASSAY KIT (Thermos Scientific) y mediante el uso de un equipo de cuantificación Qubit® 2.0 Fluorometer, para determinar los niveles de expresión de las citoquinas mediante PCR en tiempo real. Las muestras fueron cuantificadas y uniformizadas mediante diluciones para llegar a una concentración aproximada de 2ηg/µL de ARN total, por lo que se uso 2 µL de la muestra, lo que hicieron un total de 4ηg por reacción para la síntesis de ADNc usados en las pruebas de qPCR.

7. Síntesis de ADNc.

Para evaluar la expresión de citoquinas se procedió, en primera instancia, procesar la muestra y convertir el ARN a ADNc mediante el kit **Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR** (Thermo Fisher) bajo las siguientes condiciones:

Cuadro 4. Componentes para la síntesis de ADNc.

Componentes	Vi
%x Reaction Mix	4 µL
Maxima Enzyme Mix	2 µL
ARN	2 µL (4 ηg)
H2O	12 µL
TOTAL	20 µL

Cuadro 5. Condiciones para la síntesis de ADNc

T°	Tiempo	Ciclos
25°C	10’	1
50°C	15’	1
85°C	5’	1

8. Estandarización de la técnica de qPCR para detección y cuantificación de citoquinas.

Se procedió a determinar las temperaturas de *Annealing* adecuadas para cada *primer* y el normalizador, por ello con el ADNc se realizaron diversas pruebas de PCR en gradiente. Para ello las condiciones estandarizadas fueron las siguientes: Mix (dNTP’s 200 µM, MgCl2 2.0mM), primers 1µM, 2U de enzima *Taq* DNA polimerasa ,1µL de ADN y completando con agua ultra pura libre de nucleasas, volumen final de 15µl. La secuencia de los primers específicos para cada citocina y las referencias se observan en el Cuadro 6. La amplificación de cada uno de las citocinas y la síntesis de ADNc se realizaron

en un termociclador modelo *MyCycler termal cycler* (BIORAD) para la amplificación las citoquinas y el normalizador (Obdileg *et al*, 2004a; Obdileg *et al*, 2004b; Patil *et al*, 2004; Obdileg *et al*, 2005; More, 2010).

Cuadro 6. Secuencias, tamaño, temperaturas de *Annealing* y referencias de las citoquinas usadas para la evaluación inmunogénica en alpacas

	Genes	**Secuencias**	**Amplified Products (bp)**	**Tm**	**Referencia**
Th1	IFN – γ	5′-ATTGTCTCCTTCTACTTCAA-3′ 5′-AGCGGAAGAGAAGTCAGAAT -3′	258	45	Obdileg *et al.*, 2008
	TNF-α	5′-CTACTCCCAGGTCCTCCTGA-3′ 5′-GGTAGTTGGGCATGTTGATC-3′	251	60	Obdileg *et al.*, 2005
	IL-2	5′-AAACTCTCCAGGATGCTCAC-3′ 5′-GGAACTGAAGGGATCTGAAA-3′	202	49	Obdileg *et al.*, 2006
Th2	IL-4	5′-CAAAGAACACAACTGAGAAG-3′ 5′-GGCTAAAGAAGATTATGAAG-3′	203	46	Obdileg *et al.*, 2006
	IL-10	5′-AAGCCTTGTCGGAGATGAC-3′ 5′-AGCCATGAGTGAGTTCGACA-3′	246	55	Obdileg *et al.*, 2006
Normalizador	GAPDH	5′-GTGAAGGTCGGAGTGAACG-3′ 5′-GAGATGATGACCCTCTTGGC-3′	356	60	Patil *et al.*2004

Cuadro 7**.** Condiciones para la la estandarización de la PCR para las citoquinas.

Fase	**Temperatura**	**Tiempo**	**Ciclos**
Desnaturalización inicial	95°	5’	1
Desnaturalización	95	30’’	35
Hibridación	(según cada gen a evaluar)	30’’	
Elongación	72	35’’ (40’’ para GAPDH)	
Extensión final	72	10’	1

Una vez realizado este paso se procedió a estandarizar la prueba Real Time PCR (qPCR) de cada citoquina y el normalizador, realizando diluciones (1:1, 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100) y tres repeticiones por cada dilución. Las condiciones estandarizadas fueron las siguientes: SyBr Green reaction mix 1X (10µl), cada primers a 0.3µM, ADNc 2µl y H_2O completando un volumen final de 20µl.

Cuadro 8. Componentes para la qPCR de las muestras extraídas.

Reactivos	Conc. Inicial	Conc. Final	Volumen
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	2X	X	10 µl
Forward Primer	10µM	0.3 µM	0.75 µl
Reverse Primer	10µM	0.3 µM	0.75 µl
Template cDNA			2 µl
Water, Nuclease-free			6.5 µl
Total volumen			20 µl

Cuadro 9**.** Condiciones para la qPCR de las muestras extraídas, donde X corresponde a la T° de Hibridación (*Annealing*) según el gen a evaluar.

Condiciones y ciclos térmicos			
	Temperatura	**Tiempo**	**Repeticiones**
tUDG	50	2min	
T_D	95°C	10 min	1
T_D	95°C	30 sec	
T_A	x°C	30 sec	40
T_E	72°C	35 sec	
Melt curve	x-95 °C		1

Usando los promedios de los valores Ct (Ciclo umbral) de cada dilución, fueron enfrentados con los valores del logaritmo de la concentración de ADNc de las muestras en un cuadro de dispersión para ver la relación entre ambas variables. La eficiencia de la prueba se demuestra mediante el R^2 el cual debe ser cercano o mayor al 0.98.

9. Aplicación de la técnica de PCR en Tiempo Real

El RT-PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific), usando como fluoróforo Maxima SYBR Green. Se utilizó el ADNc (4ηg aproximadamente) sintetizado a partir del ARNm obtenido durante

la extracción de los cultivos celulares incubados en diferentes tiempos. Se emplearon primers específicos para cada citoquina y el normalizador (Cuadro 6). Se utilizaron los mismos componentes y condiciones descritas anteriormente (Cuadro 8 y Cuadro 9 respectivamente), colocando las en un rack de 96 pocillos específicos para el termociclador PikoReal 96 (*Thermo Scientific*) en donde se colocaron para la corrida respectiva.

10. Análisis de Niveles de Expresión

8.1. Cuantificación relativa

Para la cuantificación relativa de las citoquinas fue usado el método del Ct comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), que permite comparar las curvas de amplificación de las citoquinas de los tratamientos frente a las curvas de amplificación de las citoquinas producidas en el grupo control.

Esta aproximación sigue la siguiente fórmula:

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

Donde:
N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador
ΔΔCt = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador

11. Análisis Estadístico

El presente trabajo es un estudio de carácter descriptivo por lo que los resultados se mostrarán en figuras y cuadros descriptivos.

VI. RESULTADOS

1. Expresión de genes evaluados

Se evaluó primero el gen normalizador:

1.1. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH)

Se procesaron 27 muestras para el gen GAPDH necesarias para los cálculos de expresión relativa de los otros 5 genes en evaluación, por 3 veces por lo que obtuvimos datos de 81 reacciones. Cabe resaltar que este gen tuvo tres temperaturas de Melting promedio, un 33.33% tuvo un temperatura de melting promedio de 81.707°C (DS=0.123) con un rango de valores que oscilaban de 81.49°C a 81.92°C, un 44.44% obtuvo una Temperatura de Melting promedio de 83.871 (DS=0.071) y un rango de valores de 83.75-83.98°C, y finalmente un 22.23% con una T. de melting de 84.116°C de promedio (DS=0.007) con un rango de valores de 84-84.22°C, lo cual se observa en la Figura 3. Se decidió realizar un gel de agarosa al 2% y se corrieron las muestras por 2 horas a 100V observándose que amplificaban a una banda de 356bp.

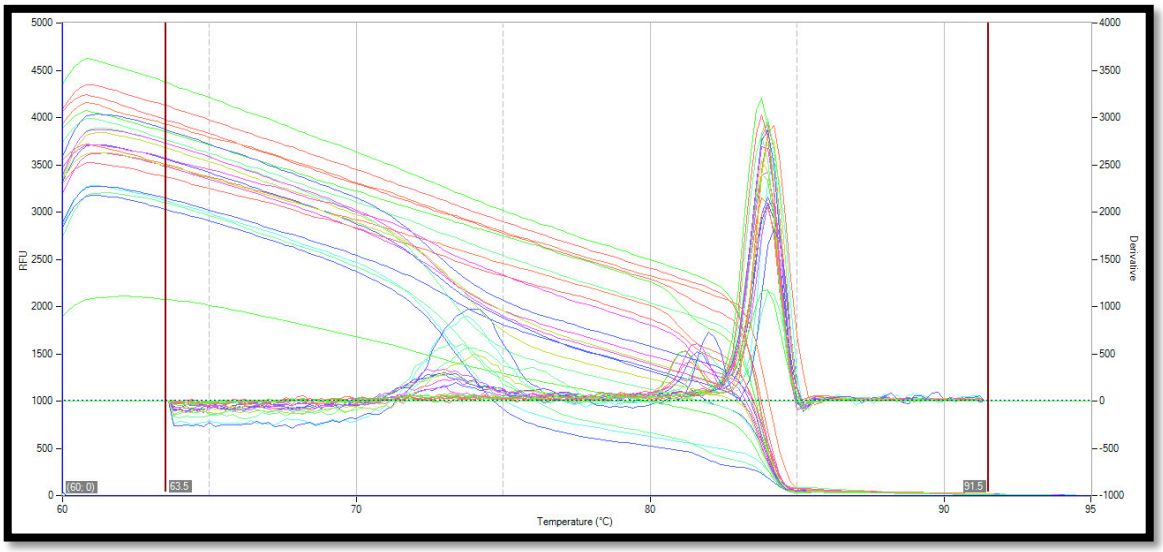


Figura 3. Gráfico de las temperaturas de Melting para el gen GAPDH, nótese que la mayoría de muestras amplifica a 83°C de promedio.

Luego se procedió a obtener los valores Ct (Ciclo Umbral, Cq en las lecturas del termociclador usado) del gen GAPDH en los tiempos establecidos en el estudio obteniéndose los siguientes datos:

Cuadro 10. Valores Cq del Gen GAPDH con respecto al tiempo de exposición.

Tiempo	Cq promedio
0h	28.272
3h	29.750
6h	25.684
9h	25.474
12h	28.799
18h	28.652
24h	32.027
48h	31.958
72h	29.178

.

1.2. TNF-α

Se procesaron 27 muestras para el gen de TNF-α, con el fin de observar sus niveles de expresión durante el desafío frente a la proteína recombinante desde las 3h hasta las 72h post desafío, por triplicado por lo que obtuvimos datos de 81 reacciones. Cabe resaltar que este gen tuvo dos temperaturas de Melting promedio, un 70% tuvo una temperatura de melting promedio de 72.456°C (DS=0.134) con un rango de valores que oscilaban de 72.15-72.74°C y un 30% obtuvo una Temperatura de Melting promedio de 73.377°C (DS=0.17) y un rango de valores de 73.03-73.64°C, datos que se observan en la Figura 4. Al igual que con GAPDH se decidió realizar un gel de agarosa al 2% y se corrieron las muestras por 2 horas a 100V observándose que amplificaban a una banda de 251bp.

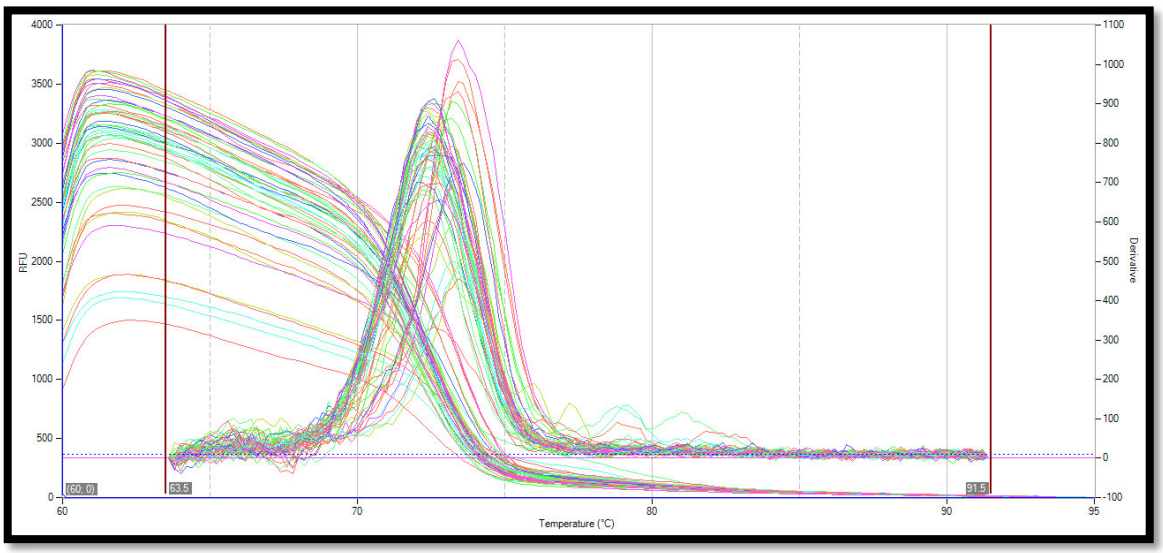


Figura 4. Gráfico de las temperaturas de Melting para el gen de TNF-α, nótese que la mayoría de muestras amplifica a 72°C de promedio.

Cuadro 11. Valores Cq del Gen de TNF-α con respecto al tiempo de exposición.

Tiempo	Cq promedio
0h	28.805
3h	26.935
6h	23.537
9h	23.833
12h	27.027
18h	28.435
24h	26.80
48h	25.143
72h	26.143

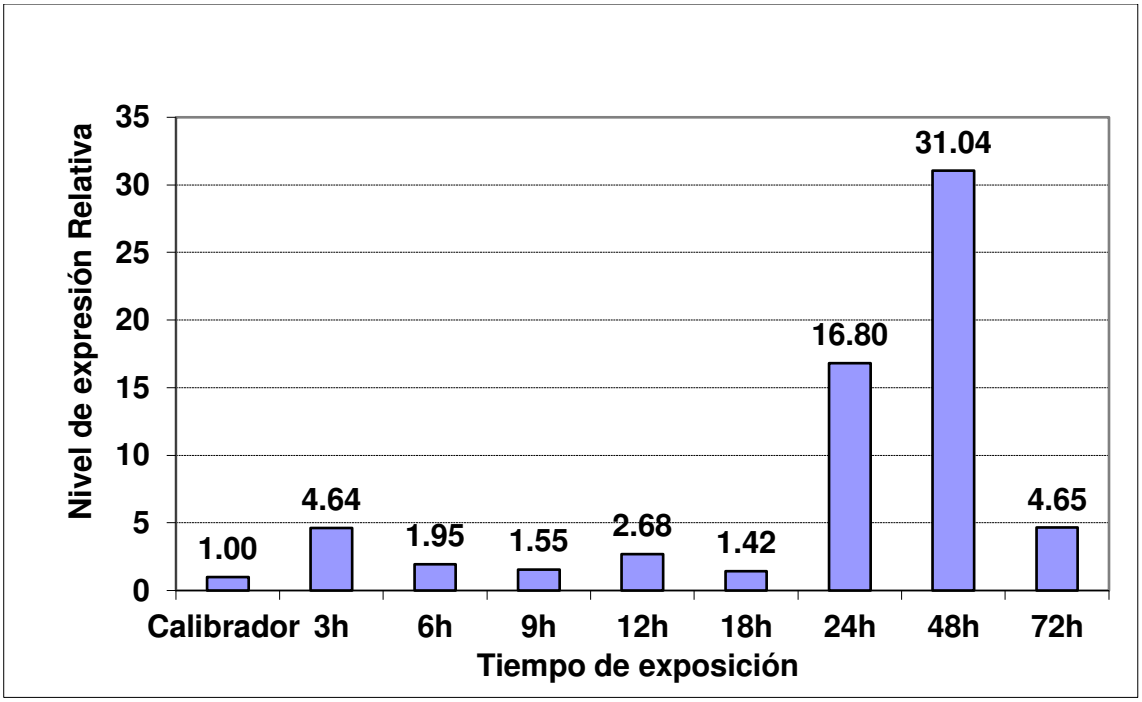


Figura 5. Expresión relativa de TNF-α en PBMC de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. Cada barra representa las veces que se expresa TNF-α con respecto al tiempo de exposición.

1.3. IL-2

Se procesaron 27 muestras para IL-2, con el fin de observar sus niveles de expresión durante el desafío frente a la proteína recombinante desde las 3h

hasta las 72h post desafío, por triplicado por lo que obtuvimos datos de 81 reacciones. Se obtuvo una temperatura Melting promedio de 83.673 para todas las muestras, con unrango de valores que oscilaban de 83.35-83.94°C y una desviación estándar de 0.133°C.

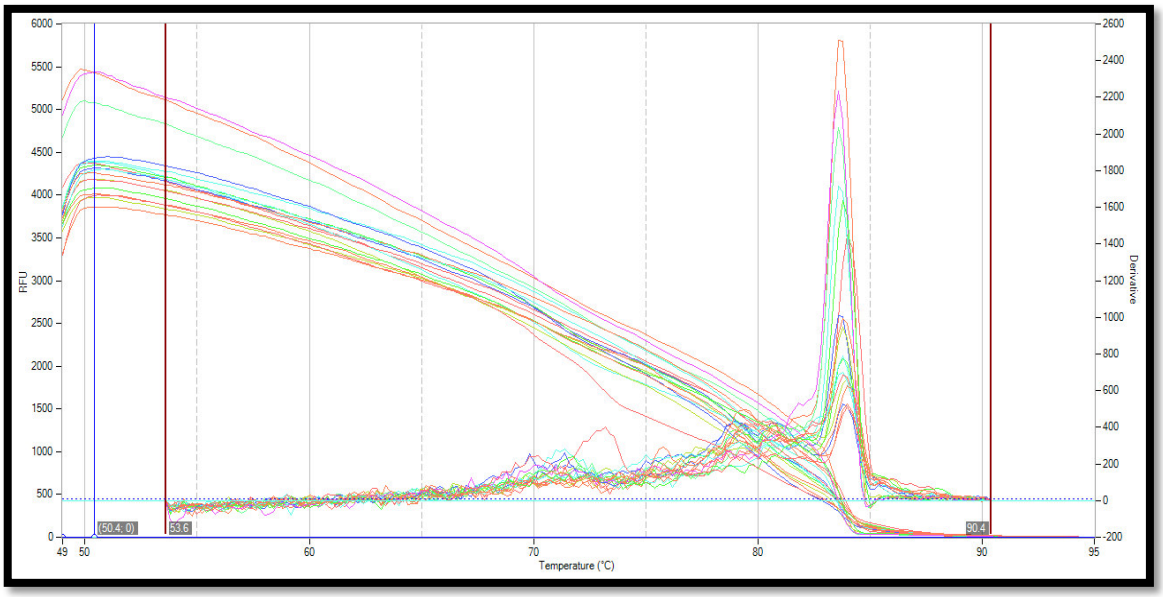


Figura 6. Gráfico de las temperaturas de Melting para el gen de IL-2, nótese que las muestras amplifican a 83°C de promedio.

Luego se obtuvieron los datos a continuación:

Cuadro 12. Valores Cq para IL-2 con respecto al tiempo de exposición.

Tiempo	Cq promedio
0h	31.882
3h	32.42
6h	28.183
9h	27.845
12h	31.833
18h	31.57
24h	35.977
48h	33.7698
72h	30.242

Luego se procedió a evaluar sus niveles de expresión con la fórmula antes mencionada, obteniendo el siguiente gráfico.

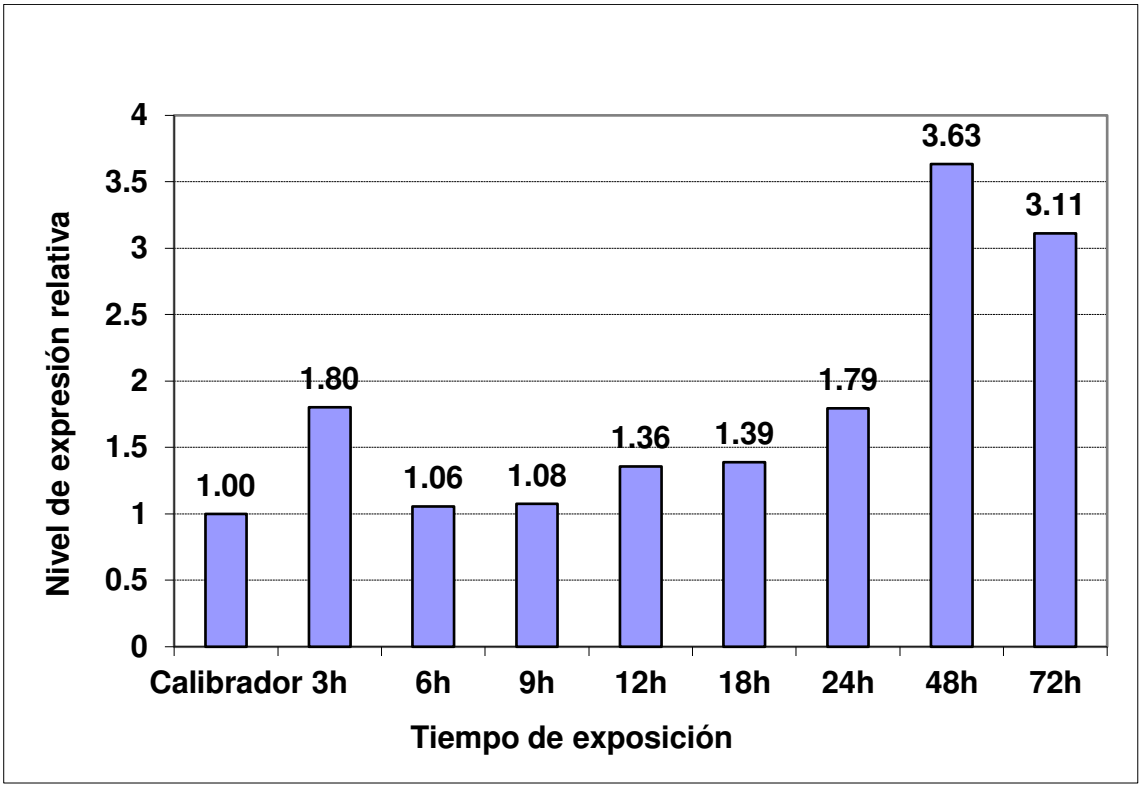


Figura 7. Expresión relativa de IL-2 en PBMC de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. Cada barra representa las veces que se expresa IL-2 con respecto al tiempo de exposición.

1.4. IFN-γ

Se procesaron 27 muestras para IFN-γ, con el fin de observar sus niveles de expresión durante el desafío frente a la proteína recombinante desde las 3h hasta las 72h post desafío, por triplicado por lo que obtuvimos datos de 81 reacciones. Cabe resaltar que este gen tuvo dos temperaturas de Melting promedio, un 53.84% tuvo una temperatura de melting promedio de 76.9°C (DS=0.070) con un rango de valores que oscilaban de 76.74-76.99°C y un 46.16% obtuvo una Temperatura de Melting promedio de 77.3°C (DS=0.271) y un rango de valores de 77.01-77.90°C, datos que se observan en la Figura 8.

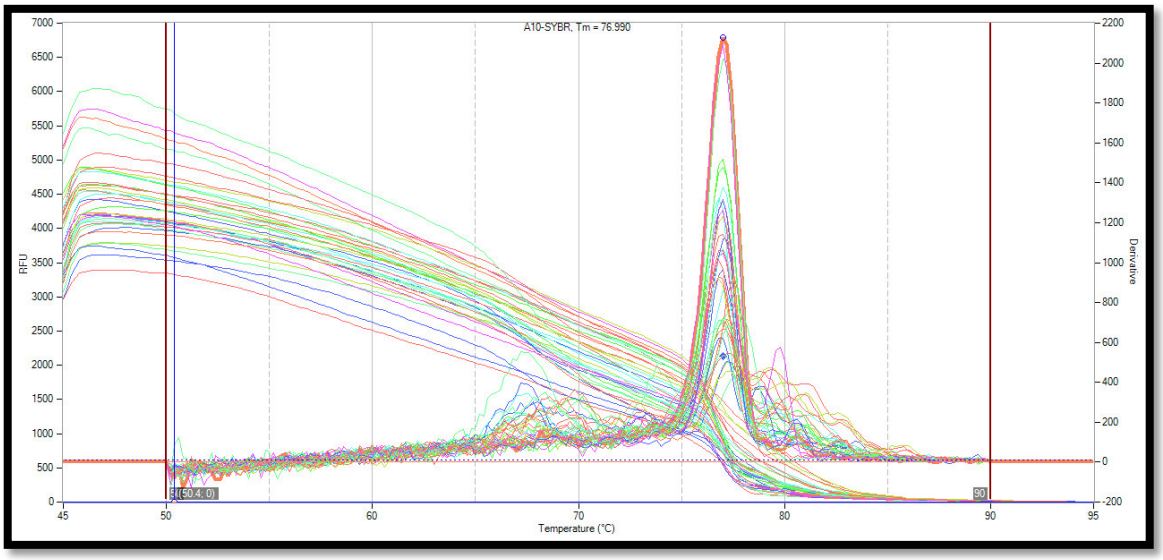


Figura 8. Gráfico de las temperaturas de Melting para IFN-γ, nótese que las muestras amplifican entre 76-77°C.

Cuadro 13. Valores Cq para IFN-γ con respecto al tiempo de exposición.

Tiempo	Cq promedio
0h	34.889
3h	32.57
6h	31.105
9h	30.563
12h	32.23
18h	31.33
24h	35.64
48h	34.117
72h	32.19

Luego se procedió a evaluar sus niveles de expresión con la fórmula antes mencionada, obteniendo el siguiente gráfico.

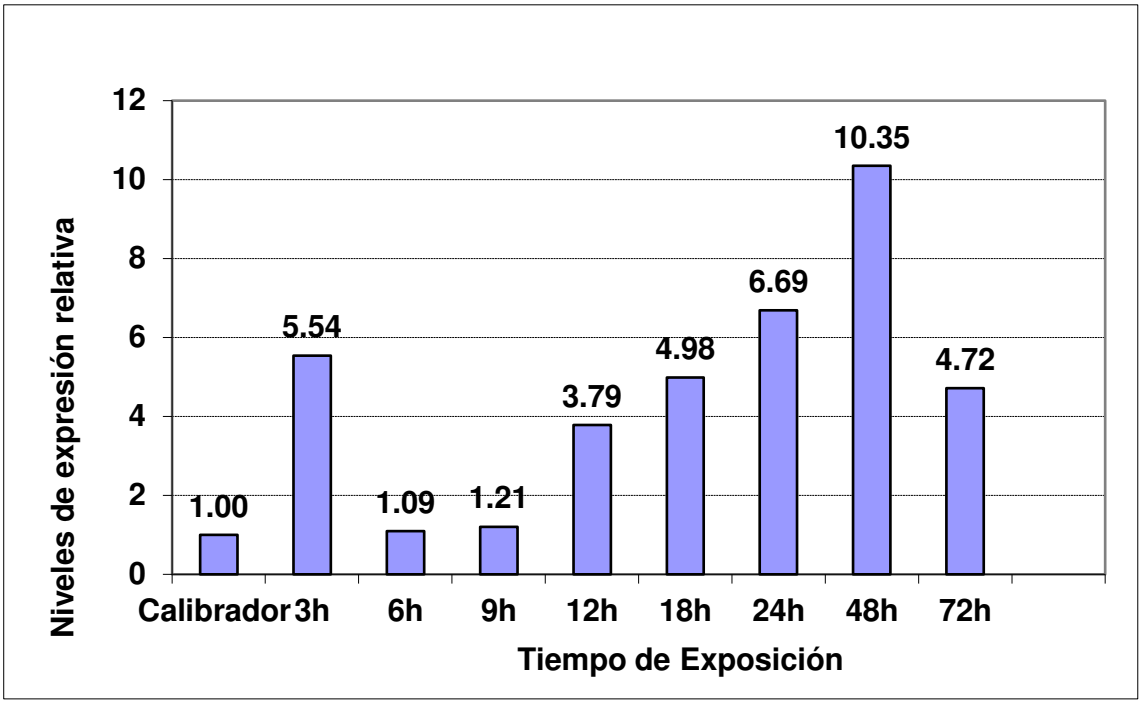


Figura 9. Expresión relativa de IFN-γ en PBMC de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6like. Cada barra representa las veces que se expresa IFN-γ con respecto al tiempo de exposición.

1.5. IL-10

Se procesaron 27 muestras para IL-10, con el fin de observar sus niveles de expresión durante el desafío frente a la proteína recombinante desde las 3h hasta las 72h post desafío, por triplicado por lo que obtuvimos datos de 81 reacciones. Cabe resaltar que este gen tuvo dos temperaturas de Melting promedio, un 41% tuvo una temperatura de melting promedio de 74.79°C (DS=0.213) con un rango de valores que oscilaban de 74.17-74.99°C y un 59% obtuvo una Temperatura de Melting promedio de 75.09°C (DS=0.078) y un rango de valores de 75.0-75.35°C, datos que se observan en la Figura 10.

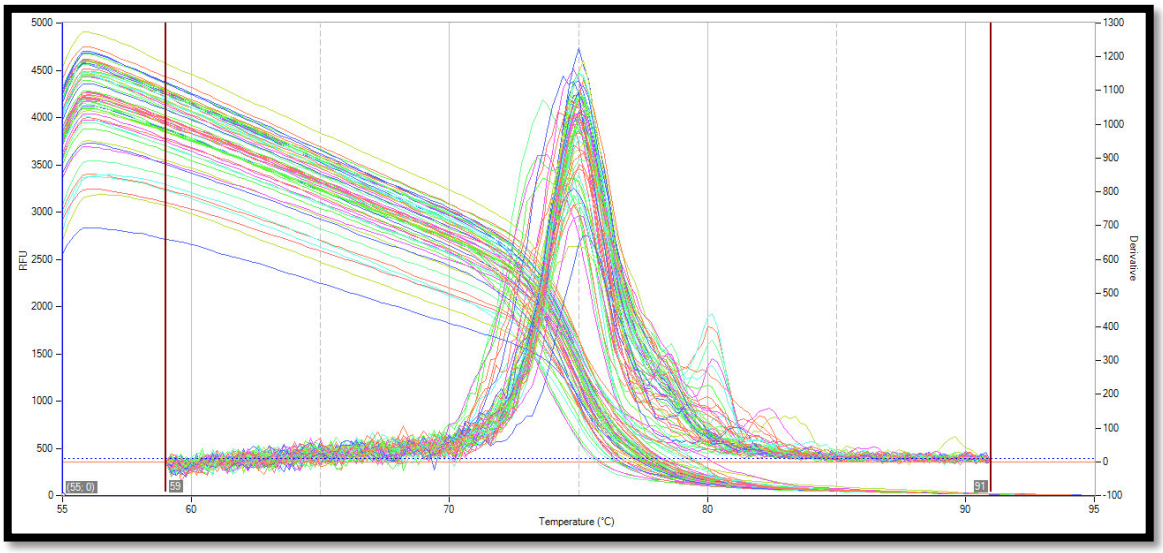


Figura 10. Gráfico de las temperaturas de Melting para IL-10, nótese que las muestras amplifican entre 74-75°C.

Luego se obtuvieron los datos a continuación:

Cuadro 14. Valores Cq para IL-10 con respecto al tiempo de exposición.

Tiempo	Cq promedio
0h	28.272
3h	28.424
6h	24.31
9h	23.706
12h	25.21
18h	24.55
24h	25.728
48h	24.677
72h	24.917

Luego se procedió a evaluar sus niveles de expresión con la fórmula antes mencionada, obteniendo el siguiente gráfico.

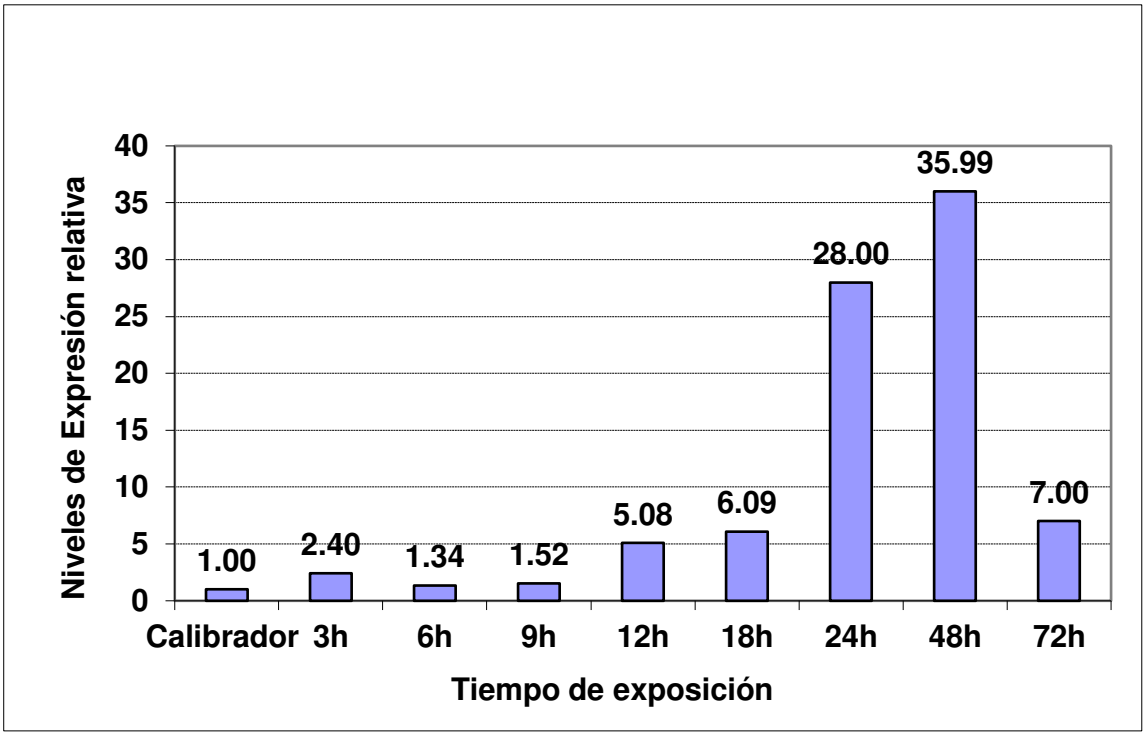


Figura 11. Expresión relativa de IL-10 en PBMC de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. Cada barra representa las veces que se expresa IL-10 con respecto al tiempo de exposición.

1.6. IL-4

Se procesaron 27 muestras para IL-4, con el fin de observar sus niveles de expresión durante el desafío frente a la proteína recombinante desde las 3h hasta las 72h post desafío, por triplicado por lo que obtuvimos datos de 81 reacciones. Los productos amplificados tuvieron una temperatura de Melting promedio de 75.3°C (DS=0.2343) con un rango de valores que oscilaban de 75.02-75.95° datos que se observan en la Figura 12.

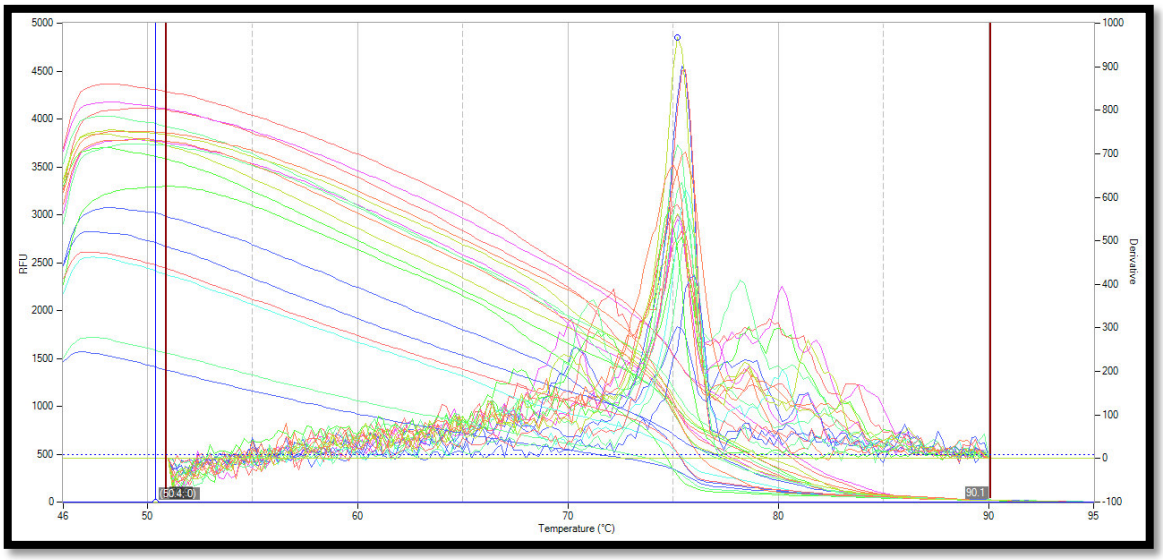


Figura 12. Gráfico de las temperaturas de Melting para IL-4, nótese que las muestras amplifican en una temperatura promedio de 75°C.

Cuadro 15. Valores Cq para IL-4 con respecto al tiempo de exposición.

Tiempo	Cq promedio
0h	35.305
3h	33.75
6h	31.07
9h	31.337
12h	35.183
18h	32.952
24h	35.093
48h	34.919
72h	31.857

Luego se procedió a evaluar sus niveles de expresión con la fórmula antes mencionada, obteniendo el siguiente gráfico.

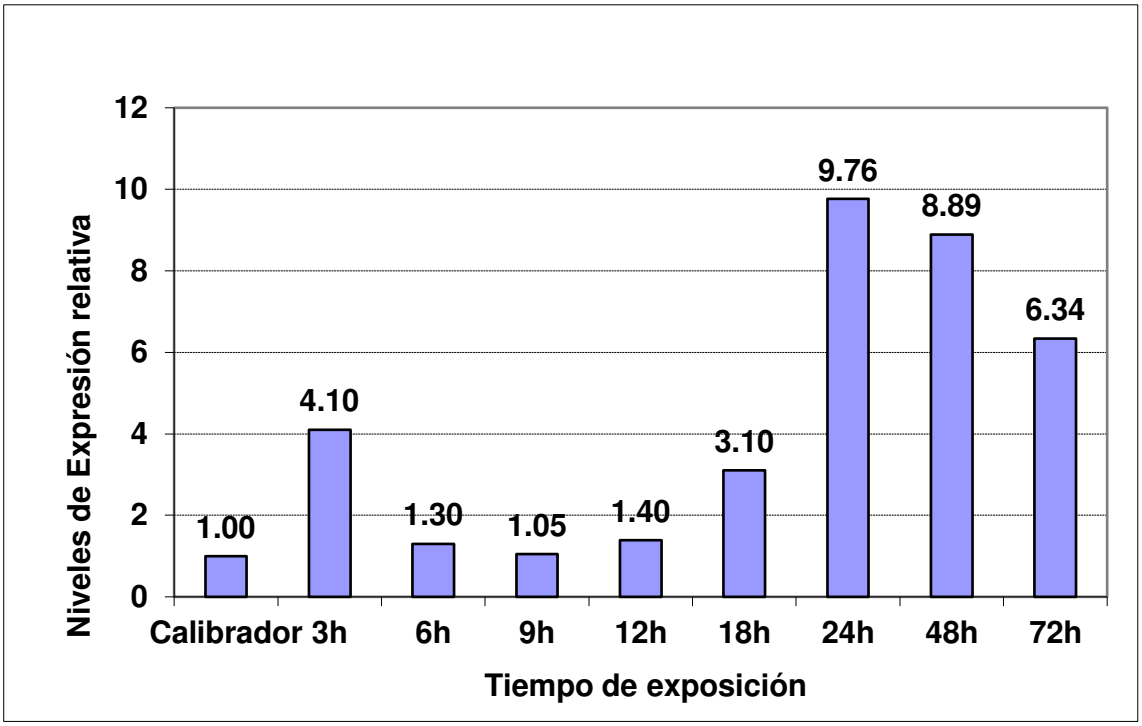
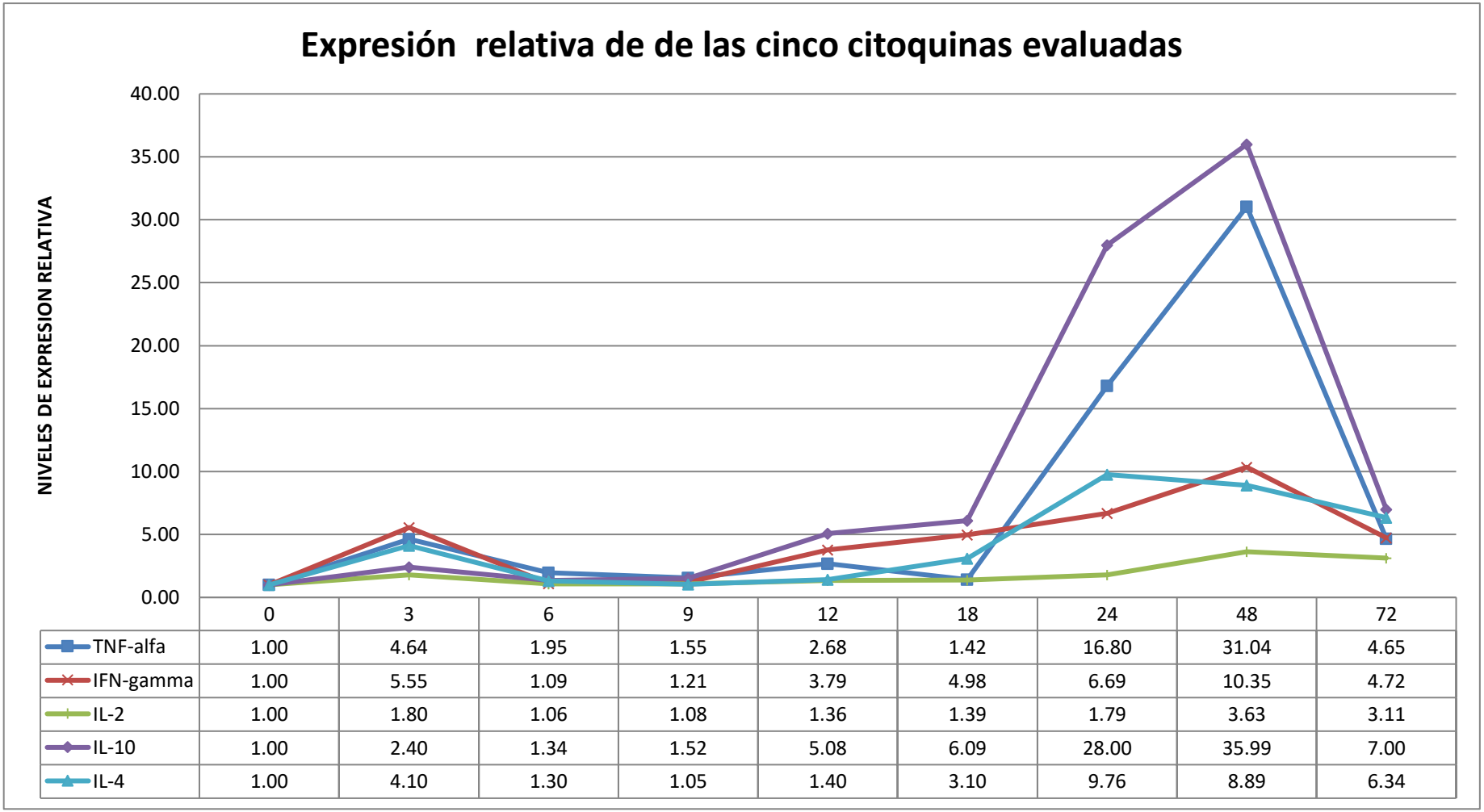


Figura 13. Expresión relativa de IL-4 en PBMC de alpaca por tiempo de exposición a la proteína recombinante P6-like. Cada barra representa las veces que se expresa IL-4 con respecto al tiempo de exposición.

En general, el siguiente gráfico (Figura 14) puede observarse la cinética de expresión de las cinco citoquinas evaluadas desde las 3 horas hasta las 72 horas post desafío a la proteína recombinante P6-like de *P. multocida*, para ser luego comparadas entre ellas.



	0	3	6	9	12	18	24	48	72
TNF-alfa	1.00	4.64	1.95	1.55	2.68	1.42	16.80	31.04	4.65
IFN-gamma	1.00	5.55	1.09	1.21	3.79	4.98	6.69	10.35	4.72
IL-2	1.00	1.80	1.06	1.08	1.36	1.39	1.79	3.63	3.11
IL-10	1.00	2.40	1.34	1.52	5.08	6.09	28.00	35.99	7.00
IL-4	1.00	4.10	1.30	1.05	1.40	3.10	9.76	8.89	6.34

Figura 14: Curva de expresión de las cinco citoquinas evaluados con respecto al tiempo de exposición, evidenciándose una marcada expresión de IL-10 y TNF-α.

Con la finalidad de observar si hubo diferencias de expresión para IL-10 y TNF-α se procedió a ver los niveles de expresión de esas citoquinas junto con el GAPDH en PBMC sin estimulo a las 3, 24 y 48h de incubación, corroborándose que tanto TNF-α como IL-10 corresponden a estímulos atribuidos a la proteína recombinante.

Cuadro 16. Valores Cq para GAPDH sin estímulo a las 3, 24 y 48h de incubación.

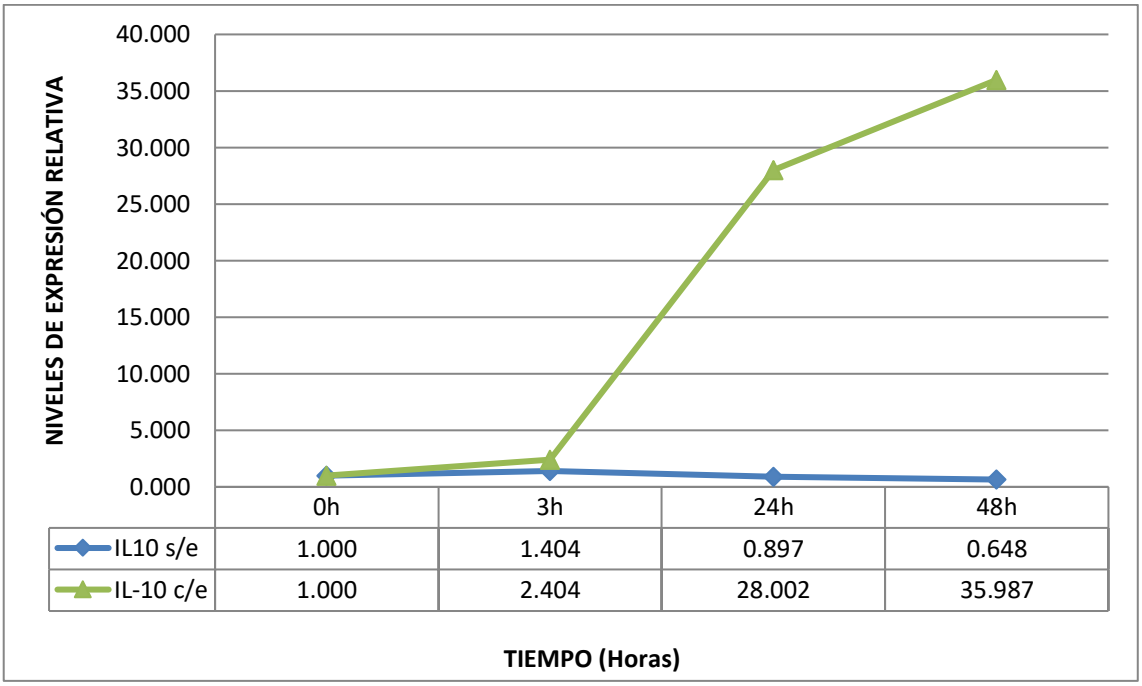
Tiempo	Cq promedio
0h	28.272
3h	29.64
24h	27.54
48h	28.51

Cuadro 17. Valores Cq para TNF-α sin estímulo a las 3, 24 y 48h de incubación.

Tiempo	Cq promedio
0h	28.805
3h	29.64
24h	28.13
48h	29.87

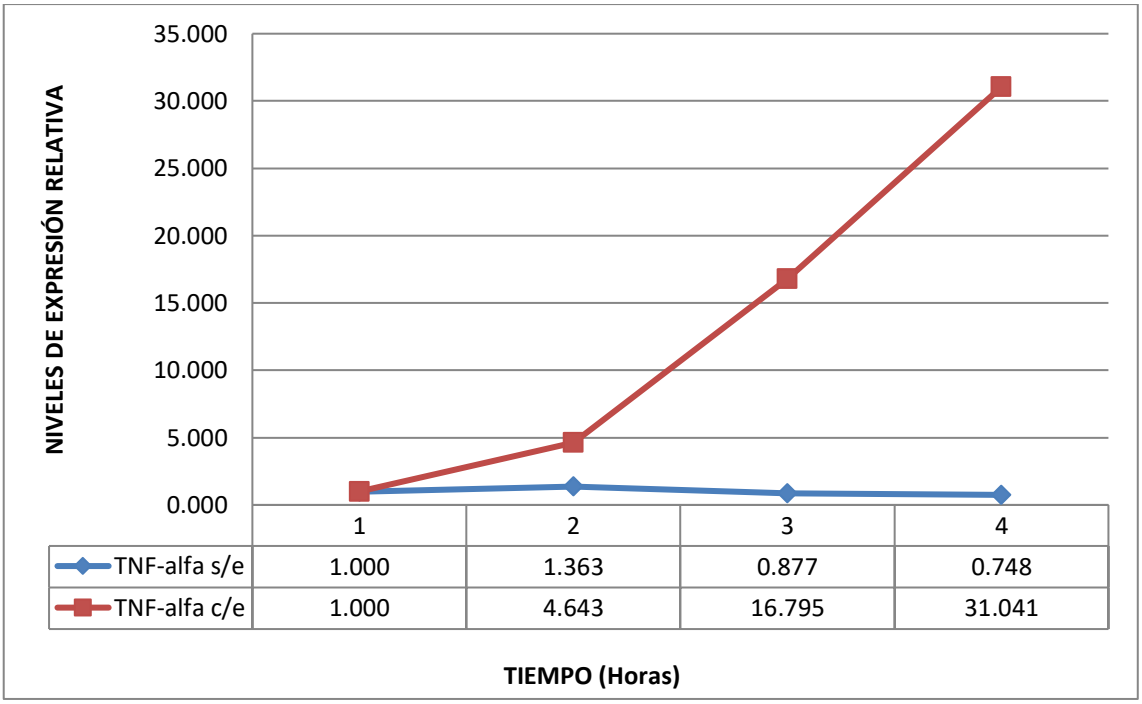
Cuadro 18. Valores Cq para IL-10 sin estímulo a las 3, 24 y 48h de incubación.

Tiempo	Cq promedio
0h	28.62
3h	29.64
24h	27.89
48h	30.05



	0h	3h	24h	48h
IL10 s/e	1.000	1.404	0.897	0.648
IL-10 c/e	1.000	2.404	28.002	35.987

Figura 15: Gráfica comparativa de la expresíon relativa de IL-10 con y sin estimulo de la P6-like respecto al tiempo de exposición.



	1	2	3	4
TNF-alfa s/e	1.000	1.363	0.877	0.748
TNF-alfa c/e	1.000	4.643	16.795	31.041

Figura 16: Gráfica comparativa de la expresíon relativa de TNF-α con y sin estimulo de la P6-like respecto al tiempo de exposición.

VII. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo la finalidad de evaluar *in vitro* la actividad inmunogénica de una proteína recombinante (P6-like) de *Pasteurella multocida* aislada de casos neumónicos fatales en crías de alpacas, tanto una respuesta Th1 (IFN-γ, IL-2 y TNF-α) como Th2 (IL-10 e IL-4). Las neumonías causadas por *P. multocida* son uno de los problemas de sanidad animal que repercuten en gran medida la producción alpaquera peruana, siendo este, uno de los agentes causales mayormente aislado en procesos neumónicos en alpacas (Cirilo *et al.*, 2012).

En los primeros ensayos de estandarización de los genes evaluados observamos mucha variación con respecto a lo que la literatura menciona (Odbileg *et al.*, 2004; Odbileg *et al.*, 2005a; Odbileg *et al.*, 2005b; Chiok, 2012, More, 2010), posiblemente por diversos motivos como los reactivos usados en las reacciones, el tipo de muestra e incluso los equipos usados.

Muchos estudios analizaron niveles de transcripción y expresión de muchas de estas citoquinas en diversos animales, entre ellos el ratón, el cerdo (Butler *et al.,* 2006), el bovino y el equino (Wagner *et al.*, 2010), e incluso en humanos (Mine *et al.*, 2004) entre otras especies, con la finalidad de elucidar el tipo y la cinética de las diferentes formas de respuesta inmune bajo condiciones especificas que conlleven a un mejor entendimiento de los procesos patológicos que implica el desarrollo de una enfermedad determinada.

En los últimos años varios autores evaluaron la expresión de diversas citoquinas en camélidos del viejo mundo como es el caso de *Camelus dromedarius* (Odbileg *et al.*, 2004; Odbileg *et al.*, 2005a) y también camélidos sudamericanos como la llama (*Lama glama*) (Odbileg *et al.*, 2004b; Odbileg *et al.*, 2005a, Odbileg *et al.*, 2006), en la alpaca (*Vicugna pacos*), específicamente respuesta en frente a antígenos crostidiales y enteropatías (Chiok, 2012, More, 2010) y respuesta a estrés de frio (Arias *et al.*, 2016), dada su cercanía evolutiva, el uso de *primers* diseñados para citoquinas especificas de camello (*Camelus Dromedarius*) sirvieron para la evaluación inmunológica en alpacas.

El presente estudio ha identificado cinéticas comunes entre las citoquinas evaluadas, tanto citoquinas del perfil Th1 como la del perfil Th2 frente a la exposición a la proteína P6-like recombinante desde las 3 horas hasta las 72 horas post desafío, aunque la diferencia entre ambos tipos de respuesta difiere en intensidad.

En el caso de las citoquinas de la respuesta Th1 observamos un aumento a de la expresión de TNF-α las tres horas de exposición (4.64 veces con respecto al calibrador) manteniéndose constante entre 1.55 veces a 2.68 veces hasta las 18h post exposición, luego del cual hay un aumento súbito a las 24 horas (16.8 veces) y llega a su mayor expresión a las 48h donde expresa hasta 31.04 veces sus niveles basales (calibrador) para luego descender a las 72 horas a 4.65 veces de expresión (Figura 23). El incremento en la expresión de TNF-α podría estar relacionado a la activación de los PBMC por parte de la proteína recombinante para la migración de diferentes células del sistema inmune en conjunto con el IFN-γ (monocitos, neutrófilos, etc.) y un aumento en la permeabilidad vascular en el sitio de establecimiento de la enfermedad (Abbas *et al.*, 2007), lo cual tiene concordancia con los hallazgos histopatológicos de diferentes pulmones con problemas neumónicos asociados a *P. multocida*. (Cirilo *et al.*, 2012; Guzmán, 2011; Guzmán *et al.*, 2013).

El incremento en la expresión de TNF-α puede deberse a la presencia de otros tipos celulares presentes en los cultivos celulares, como son los

monocitos. Debido a ellos se presenta un aumento de la expresión de TNF-α, similar a lo observado en un estudio donde se estimularon macrófagos alveolares bovinos con lipopolisacárido de *Pasteurella (Manhemmia) hayemolytica*, observándose unincremento de TNF-α a partir de las cuatro horas post-desafio, y luego llegando a una máxima expresión a las 24 horas post-estimulación (Yoo *et al*., 1995).

En el caso de IL-2 se observó un aumento de la expresión en 1.8 veces los niveles basales (calibrador), luego su expresión se mantiene constante desde las seis horas hasta las 18 horas donde se observa un ligero aumento a partir de las 24 horas y llegando a su mayor expresión a las 48 horas (3.63 veces), y decayendo a las 72 horas de exposición (3.11 veces) como se observa en la Fig. 25. Se observa ligero aumento que sería el suficiente para la activación de linfocitos maduros y su migración hacia el sitio de inflamación ya que se considera que IL2 es uno de los factores de crecimiento más importante de linfocitos T sobre todo cuando son activados por antígenos, expandiendo su número significativamente. (Malek *et al*., 2002).

En la evaluación de IFN-γ pudimos observar un aumento de 5.54 veces su expresión con respecto al calibrador, manteniéndose en bajos niveles a las seis horas y nueve horas de exposición a la proteína, comenzando un aumento gradual en la expresión desde las 12 horas (3.79 veces) y alcanzando un pico máximo de 10.35 veces a la 48 horas post desafío para luego decaer a 4.72 veces a las 72 horas (Fig. 27). El IFN-γ tiene un rol importante en la activación de los macrófagos, respuesta inmunitaria innata y respuesta celular adaptativa el cual estaría asociado, junto con el TNF-α a la presencia de monocitos, neutrófilos y linfocitos en pulmones con neumonía pasteurelósica. (Schroder *et al*., 2004, Guzmán, 2011; Cirilo *et al*., 2012; Guzmán *et al*., 2013) por estimulo de la P6-Like recombinante, eso no descarta que también estén implicados otros factores de virulencia de *Pasteurella* como es el Lipopoliscarido (Harper *et al*., 2006).

El perfil Th2, IL-10 muestra una expresión de 2.4 veces al calibrador a las tres horas de exposición a la proteína recombinante, manteniéndose estable hasta las nueve horas, para luego aumentar su expresión a las 18 horas en 6.09 veces al calibrador y subir notablemente a las 24 horas de exposición (28 veces), para alcanzar a las 48h un pico de 35.99 veces y decayendo a las 72 horas de exposición (Fig. 29). La IL-10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (CSIF sus siglas en inglés), es una citoquina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por linfocitos T y Macrófagos, inhibe la producción de las citoquinas IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-8 e IL-12 de los monocitos/macrófagos y neutrófilos y la respuesta de los linfocitos Th1 (Opal y De Palo, 2000). El aumento de esta citoquina implica una baja en la expresión de IL-2, el cual aunque tiene cierto grado de expresión mayor con respecto a su calibrador no es tan notorio si lo comparamos con otras citoquinas como TNF-α e IFN-γ, aunque este último tampoco tiene un aumento notable como lo es TNF-α, lo que se deduce que aún expresándose esas dos citoquinas, todavía están bajo influencia de la IL-10 por su carácter inmunoregulador sobre éstas (Neurath *et al.*, 2002).

IL-4 al igual que las demás citoquinas muestra un aumento de su expresión a las tres horas (4.10 veces al calibrador) para luego mantenerse constante en niveles de 1.05 a 1.40 desde las seis horas hasta las 12 horas, aumentando a las 18 horas su expresión en 3.10 con respecto al calibrador y alcanzando un pico máximo de expresión de 9.76 veces a las 24h, manteniéndose en 8.89 veces a las 48 horas y decayendo a 6.34 veces a las 72 horas de exposición, como se puede observar en la Figura 31. La IL-4 es una citoquina altamente pleiotrópica cuya producción temprana lleva a la diferenciación hacia células Th2, las que la producen de manera autocrina favoreciendo su propia diferenciación. Su producción inhibe la diferenciación de las células Th1 al regular de manera negativa la producción de IL-12 a partir de macrófagos. Se ha demostrado que es capaz de bloquear o suprimir a las citoquinas derivadas de macrófagos como IL- 1, TNF-α, IL-6 e IL-8, suprime también la actividad citotóxica de los macrófagos, muerte de parásitos intracelulares, y producción

de óxido nítrico. (Berin *et al*., 1999; Opal y De Palo, 2000). Como se puede observar, la expresión de IL-4 es mayor a las 24 y 48 horas de exposición a la proteína P6-like recombinante, pero se deduce que es insuficiente para suprimir la expresión de TNF-α que a las 48h tiene su mayor pico de expresión.

Se observa que la P6-like recombinante tiene una tendencia a estimular más a las citoquinas del perfil Th2, siendo una proteína de membrana externa es razonable que sea un perfil inmunológico neutralizante el cual actúe frente a este tipo de antígeno, pero además estimula la expresión de TNF-α, pero esto puede deducirse ser parte de una respuesta innata el cual TNF-α también forma parte, promoviendo la migración de macrófagos y neutrófilos al sitio de infección presentándose los hallazgos histopatológicos que son características de neumonías causadas por *P. multocida* (Tizard, 2013; Guzmán, 2011; Cirilo *et al*., 2012; Guzmán *et al*., 2013), aunque no se descarta que otros factores de virulencia estén implicados como es el caso del Lipopolisacárido (LPS) (Harper *et al*. 2006).

No se puede descartar también la presencia de células Asesinas Naturales (NK) en las PBMC, siendo los linfocitos totales el mayor porcentaje aislado en ellos. Como se sabe las NK promueven la liberación de diferentes citoquinas entre ellas TNF-α, IFN-γ e IL-10, por lo que la estimulación de las NK por parte de la P6-like puede ser otra de las razones del aumento de TNF-α e IL-10- durante el experimento (Hamerman *et al*., 2005; Vivier *et al*., 2011; Gabrielli *et al*., 2016). Por ello sería interesante poder determinar que tipo celular esta siendo estimulado por la P6-Like y que citoquinas está produciendo, para ello seria importante la aplicación de métodos más específicos como es la Citometría de flujo, un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características fisicoquímicas de células o partículas suspendidas en un medio líquido, permitiendo así ver múltiples parámetros celulares así como su bioquímica intracelular (Barrera *et al*., 2004; Givan 2011)

Estos resultados son muy distintos a los presentados por More (2010) que vio la expresión de citoquinas frente a una combinación de antígenos

clostridiales con ácido retinoico en intestino de alpacas, donde IFN-γ, e IL-2 aumentan su expresión, esto es posible debido al uso de todos los antígenos clostridiales por parte de ese estudio, por otro lado IL-10 y TNF-α también se incrementan, en el caso de IL-10 posiblemente el sistema inmune favorece a una respuesta Th2 la cual sabemos es mas neutralizante que citotoxico. En el caso del TNF-α posiblemente se deba a que esta citoquina también forma parte del perfil de respuesta proinflamatoria que promueva la migración de otras células del sistema inmune (Tizard, 2013). Otro estudio realizado por Chiok en el año 2012, observó la expresión de citoquinas Th1 y Th2 en crias de alpacas con enteropatías desde el nacimiento hasta la sexta semana de edad, reportando una polarización hacia el perfil Th1 en animales con enteropatía, esto puede explicarse por el uso de antígenos totales, no descartando también el tipo celular usado para evaluar el perfil citocinico, que en estos estudios fueron células de la mucosa intestinal.

En un estudio sobre la diferencia de expresión del perfil Th1 y Th2 en células mononucleares periféricas de búfalos frente al peptidoglicano del *Bacillus subtilis* observamos una tendencia al perfil Th1 con respecto a Th2, mostrándonos reducción de la expresión de IL-4 e IL-10 y un aumento notorio de TNF-α e IFN-γ(Shah *et al.*, 2012). Esta diferencia probablemente se deba a la naturaleza de las proteínas, ya que la P6-like es una proteína de membrana externa de *P. multocida*, mientras que el peptidoglicano es componente de la pared celular del *B. subtilis*. P60, una proteína de shock térmico del género *Wolbachia* induce la producción de citoquinas proinflamatorias como es el caso de TNF-α a niveles 4 o hasta 5 veces los valores basales (Kamalakannan *et al.*, 2012, esto probablemente se deba a que la TNF-α es una proteína proinflamatoria que estimuló la migración celular hacia el sitio afectado.

En un estudio sobre la estimulación citocinica en células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC por sus siglas en ingles) frente a un antígeno procedente de una vacuna inactivada del virus de la fiebre aftosa (FMDV por sus siglas en ingles) evaluaron el perfil citocinico de IL-2, IL-4 e IFN-γ, observaron que las mayores expresiones tanto de IL-2 e IFN-γ fueron a las seis

horas post inducción, en cambio IL-4 tuvo un aumento sostenido en sus niveles de expresión hasta llegar a una máxima expresión a las 24 horas post inducción. En cuanto a sus concentraciones se observa que IL-2 mantiene un aumento sostenible alcanzando mayores concentraciones a las 72 horas, e IFN-γ muestra una máxima de concentración a las 72h, muy al contrario de IL-4 que aumentó en pocas veces su concentracion y se mantiene así hasta el final, observándose que el perfil citocínico tiene una tendencia al perfil Th1 (Dar *et al.*, 2015). Esto difiere a los hallazgos encontrados en comparación con este estudio donde la mayoría de picos de expresión se obtienen a las 48 horas, a excepción de IL-4 donde se observa su máxima expresión a las 24 horas, lo cual es similar alo que se encontró en nuestro estudio. Además, en el estudio de Dar *et al.* (2015) se esperaba una tendencia al perfil Th2 debido a que es una proteína procedente de una vacuna inactivada, pero se observa una tendencia al perfil Th1 por el aumento de la citoquinas de este perfil, y una baja expresión de la IL-4 que petenece al perfil Th2, el cual difiere con los resultados obtenidos donde se observó un aumento de las citoquinas del perfil Th2 como son la IL-10 e IL-4, aunque en IL-4 no se observa que aumente considerablemente, por otro lado IL-2 e IFN-γ muestran poca expresión.

Boeuf *et al.* (2005), en un estudio para ver la eficiencia en una técnica de cuantificación absoluta de citoquinas en humanos mediante RT-qPCR, estimularon en cultivos celulares de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) con lipopolisacárido y *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (SAC), evaluaron la expresión de varias citoquinas pro inflamatorias e inflamatorias, incluyendo TNF-α, IFN-γ, IL-10 e IL-4; observaron que tanto TNF-α e IFN-γ aumentaron en su expresión. Además, se observó que IL-10 tiene un aumento en su expresión a partir de las seis horas y alcanza un pico a las nueve horas de aproximadamente 10 veces su expresión basal, seguido de IL-4 con un pico de expresión aproximadamente 20 veces a las 2 horas para luego bajar sostenidamente hasta las nueve horas, tanto en estimulo de LPS como de SAC. Sin embargo TNF-α muestra un aumento considerable en su expresión a las dos horas, por encima de las 50 veces en su expresión basal tanto en LPS como en SAC, y a las tres horas obtiene su máxima expresión

con SAC superando las 100 veces, en cambio en estimulo de LPS baja a un aproximado de 50 veces su expresión. IL-10 en comparación con nuestro estudio comenzó a tener un aumento considerable de su expresión a las 12 horas post estimulación, obteniendo una mayor expresión a las 48 horas, siendo mucho mayor la expresión relativa de esta citoquina en nuestro estudio. También observamos que IL-4 manifiesta una menor expresión relativa en nuestro estudio en comparación con el estudio de Boeuf *et al.* (2005). Por otro lado, la expresión de TNF-α tiene un aumento considerable su expresión a las dos horas post estimulo, diferente a nuestro estudio donde llega a una mayor expresión a las 48 horas post estimulación. La diferencia entre estas expresiones puede deberse a diferentes factores como la naturaleza antigénica del estímulo por LPS.

En otro estudio sobre la cinética de producción de citoquinas en PBMC humanas en respuesta al ADN de *Brucella melitensis*, observa que tanto la producción de citoquinas de IL-10 no aumenta hasta el día cuatro, incluso comienza a decrecer la concentración. En cambio IL-2 e IFN-γ muestra un aumento en su concentración con el pasar de los días, observándose una clara tendencia hacia un perfil TH1 (Lashkarbolouki *et al,.* 2005). Esto es muy diferente a los hallazgos encontrados en el presente estudio, donde IL-2 e IFN-γ muestran bajas expresiones e IL-10 aumenta su expresión con el tiempo.

En el año 2017, Shivachandra *et al.* evaluaron la inmunogenicidad de una Omp16 recombinante de *Pasteurella multocida* B:2 en modelo ratón donde se formaron dos grupos de seis animales cada uno, inoculando 50µg a cada animal en un grupo y el otro grupo fue inoculado con PBS, y finalmente evaluaron la producción de anticuerpos a los 21 días post inoculación, observándose una tendencia a la producción de anticuerpos específicos por parte de los animales inoculados con el antígeno recombinante, similar enunciado que sostiene el presente estudio.

VIII. CONCLUSIONES

- La proteína P6-Like recombinante de *Pasteurella multocida* aislado de casos fatales de neumonías en crías de alpaca estimula la expresión de citoquinas de respuesta inmune Th1 (TNF-α, IFN-γ e IL-2) y Th2 (IL-10 e IL-4) en PBMC de alpaca, aunque difiere en su intensidad.
- La proteína P6-like recombinante estimula la expresión de TNF-α e IL-10 en PBMC de alpaca.
- La proteína P6-like recombinante estimula una respuesta Th2 en PBMC de alpacas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Abbas A, Andrew H, Shiv P. 2007.** Cellular and Molecular Immunology 6th edition. ELSEVIER. 273-75p.
2. **Adachi S, Rothenberg EV. 2005.** Cell-type-specific epigenetic marking of the IL-2 gene at a distal cis-regulatory region in competent, nontranscribing T-cells. *Nucleic acids research* 33(10):3200-10.
3. **Adhikari P, Kirby SD, Nowalk AJ, Veraldi KL, Schryvers AB, y Mietzner TA. 1995.** Biochemical characterization of *Haemophilus influenza* periplasmic iron transport operon. *Journal of Biological Chemistry* 42, 25142-25149
4. **Adu-Bobie J, Capecchi B, Serruto D, Rappuoli R, Pizza M. 2003.** Two years into reverse vaccinology. *Vaccine* 21(7-8):605-10.
5. **Aldridge AJ. 2002.** Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. *Eur J Surg* 168:204–214.
6. **Ameghino E, De Martíni J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima, Perú. P 71-80.
7. **Ameghino E. y Calle S. 1989.** Aislamiento de *Pasteurella multocida* de procesos neumónicos en crías de alpaca. En: XII Reunión Científica Anual del APPA. Lima: Asociación Peruana de Producción Animal.
8. **Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE y Bisgaard M. 1999.** Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA/DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia*

granulomatis comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1, 67-86.

9. **Arias W, Sandoval N, Chavera A, Manchego A. 2011**. Caracterización de la Citoarquitectura Explénica fetal en Alpacas (*Lama pacos*). *Rev Inv Vet Peru* 22(2): 81-88.
10. **Arias N, Velapatino B, Hung A y Cok Jaime. 2016.** Cytokines Expressión in Alpacas and Llamas exposed to cold stress. *Small Ruminant Reseach* 141:135-140.
11. **Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. 2001.** Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LOD-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock*, 16: 340–343.
12. **Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert A-K. 2006.** Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood***,** 107(8):3167-72.
13. **Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG y Lewis GK. 2005.** *Pasteurella multocida* toxin activates human monocyte-derived and murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro but suppresses antibody production in vivo. *Infect Immun* 73: 413–421.
14. **Barrera LM, Drago Ma, Zamora AC, Gómez F, Del Rosario T, Mendoza F. 2004.** Citometria de Flujo: Vínculo entre la Investigación Básica y la Aplicación Clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* Vol 17(1):42-55.
15. **Benson MJ, Pino-lagos K, Rosemblatt M, Noelle RJ. 2007.** All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *JEM*, 204(8):1765-1774.
16. **Berin MC, Yang P, Ciok L, Waserman S, Perdue MH. 1999.** Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium of permeability. *Am J Physiol Cell Physiol*, 276:1046-1052.

17. **Biberstein EL, Jang SS, Kass PH y Hirsh DC. 1991.** Distribution of indoleproducing urease-negative pasteurellas in animals. J Vet Diagn Invest 3, 319-323.

18. **Birkbeck TH, Laidler LA, Grant AN y Cox DI. 2002.** *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 699-704.

19. **Bisgaard M, Abdullahi MZ, y Gilmour NJ. 1991a.** Further studies on the identification of *pasteurellaceae* from cattle lungs. *Vet.Rec*. 128, 428-429.

20. **Bisgaard M, Houghton S, Mutters R y Stenzel A. 1991b.** Reclassification of German, British and Dutch Isolates of so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. *Vet Microbiol* 26, 115-124.

21. **Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H y Bisgaard M. 2007.** Reclassification of (*Pasteurella*) *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 666-674**.**

22. **Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL y Bisgaard M. 2005.** Reclassification of Pasteurella gallinarum, (Haemophilus) paragallinarum, Pasteurella avium and Pasteurella volantium as Avibacterium gallinarum gen. nov., comb. nov., Avibacterium paragallinarum comb. nov., Avibacterium avium comb. nov. and Avibacterium volantium comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 353-362.

23. **Blackall PJ, Fegan N, Chew GT y Hampson DJ. 1998.** Population structure and diversity of avian isolates of Pasteurella multocida from Australia. *Microbiology* 144 (Pt 2), 279-289.

24. **Blackall PJ, Fegan N, Pahoff JL, Storie GJ, McIntosh GB, Cameron RD, O'Boyle D, Frost AJ, Bara MR, Marr G, y Holder J. 2000.** The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis. *Vet Microbiol* 72, 111-120.

25. **Blackall PJ, Pahoff JL y Bowles R. 1997.** Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet Microbiol* 57, 355-360.

26. **Blackall, PJ, Pahoff, JL, y Bowles R. 1997.** Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet Microbiol* 57, 355-360.

27. **Blocker D, Berod L, Fluhr JW, Orth J, Idzko M, Aktories K y Norgauer J. 2006.** *Pasteurella multocida* toxin (PMT) activates RhoGTPases, induces actin polymerization and inhibits migration of human dendritic cells, but does not influence macropinocytosis. *Int Immunol* 18: 459–464.

28. **Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, Loizon S, Barale J, Akanmori B, Mercereau-Puijalon O, Behr C. 2005.** CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. BMC *Immunology 6:5*.

29. **Bowles RE, Pahoff JL, Smith BN, y Blackall PJ. 2000.** Ribotype diversity of porcine *Pasteurella multocida* from Australia. *Aust Vet J* 78, 630-635.

30. **Boyce J, Lo RY, y Wilkie I. 2004.** *Pasteurella* and *Mannheimia*. In Pathogenesis of Bacterial Infections of Animals. *J.Blackwell Publishing*, Iowa.USA. 285-294.

31. **Boyce JD y Adler B 2000.** The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* 68: 3463–3468.

32. **Boyce JD, Cullen PA, Nguyen V, Wilkie I y Adler B. 2006.** Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane subproteome and its response to the in vivo environment of the natural host. Proteomics 6: 870–880.

33. **Boyce JD, Seemann T, Adler B, Harper M. 2012.** Pathogenomics of Pasteurella multocida. Curr Top *Microbiol Immunol* 361:23-38. doi: 10.1007/82_2012_203.

34. **Boyman O, Sprent J. 2012.** The role of interleukin - 2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Publishing Group* 12(3):180-190. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nri3156**.**

35. **Budak F, Goral G, Heper Y., Yilmaz E., Aymak F., Bas-turk B., Tore O., Ener B., Oral H.B. 2007.** IL-10 and IL-6 gene polymorphisms as potential host susceptibility factors in Brucellosis. *Cytokine* 38: 32–36.

36. **Burmester G, Pezzutto A. 2003.** Color Atlas of Immunology. George Thieme Verlag. Stuttgart – Germany. p. 322.

37. **Burril TJ. 1883.** New species of Micrococcus (bacteria). *Am Nat* 17, 319-320.

38. **Bustin SA. 2005.** Real-Time PCR Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics 1117 DOI: 10.1081/E-EDGP 120020684

39. **Bustinza AV, Burfening PJ, Blackwell RL**. 1988. Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). *J Anim Sci* 66: 1139-1143.

40. **Bustinza V. 2001.** La alpaca, conocimiento del gran potencial andino. Puno: Univiversidad Nacional del Altiplano. 343 p.

41. **Butler JE, Sinkora M, Wertz N, Holtmeier W, Lemke CD. 2006.** Development of the neonatal B and T Cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet Res* 37: 417-441.

42. **Capitini CM, Herrero IA, Patel R, Ishitani MB and Boyce TG. 2002.** Wound infection with Neisseria weaveri and a novel subspecies of Pasteurella multocida in a child who sustained a tiger bite. *Clin Infect Dis* 34: e74–e76.

43. **Carwell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N & Williamson B. 1975.** An endotoxin induced serum factor wich cause necrosis of tumours. *Proc Natl Acad Sci* 72,3666.

44. **Carter GR y Chengappa MM. 1980.** Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. *J Clin Microbiol* 11: 94–96.

45. **Carter GR. 1955.** Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* 16, 481-484.

46. **Carter GR. 1967.** Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. *Ad Vet Sci* 11, 321-379.

47. **Chen HI, Hulten K y Clarridge JE. 2002.** Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. *J Clin Microbiol 40*, 3438-3441.

48. **Chiok K. 2012.** Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN-γ e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en mucosa intestinal de crias de alpacas (Vicugna pacos) sanas y con enteropatia. Tesis de Magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

49. **Choi-Kim K, Maheswaran SK, Felice LJ y Molitor TW. 1991.** Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida. Vet Microbiol* 28: 75–92.

50. **Christensen JP y Bisgaard M. 2000.** Fowl cholera. *Rev Sci Tech* 19, 626-637.

51. **Christensen H, Foster G, Christensen JP, Pennycott T, Olsen JE y Bisgaard M. 2003.** Phylogenetic analysis by 16S rDNA gene sequence comparison of avian taxa of Bisgaard and characterization and description of two new taxa of Pasteurellaceae. *J Appl Microbiol* 95, 354-363.

52. **Christensen H, Angen O, Olsen JE, y Bisgaard M. 2004.** Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiology* 150, 1757-1767.

53. **Christensen H, Bisgaard M, Angen O, Frederiksen W, y Olsen JE. 2005.** Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J Clin Microbiol* 43, 259-270.

54. **Christensen H, Bertelsen MF, Bojesem AM, Bisgaard M. 2012.** Classification of *Pasteurella* species B as *Pasteurellla oralis* sp. nov. *Int Syst Evol Microbiol* 62 (P6): 1396-401.

55. **Christiansen K, Carpenter T, Snipes Km Hrd D y Ghazikhanian G. 1992.** Restriction endonuclease analysis of *Pasteurella multocida* isolates from three California turkey premises. *Avian Dis* 36, 272-281.

56. **Chuba PJ, Bock R, Graf G, Adam T, y Gobel U. 1988.** Comparison of 16S rRNA sequences from the family *Pasteurellaceae*: phylogenetic relatedness by cluster analysis. *J Gen Microbiol* 134, 1923-1930.

57. **Chung JY, Wilkie I, Boyce JD y Adler B. 2005.** Vaccination against fowl cholera with acapsular Pasteurella multocida A:1. *Vaccine* 23: 2751–2755.

58. **Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M y Adler B. 2001.** Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 69: 2487–2492.

59. **Cirilo E, Manchego A, Rivera H y Rosadio R. 2012.** Coexistencia de virus y bacterias en neumonías agudas en alpacas neonatas. Rev Inv Vet Perú 23 (3): 317-335.

60. **Confer AW, McCraw RD, Durham JA, Morton RJ, Panciera RJ. 1995.** Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Immunol Immunopathol* 47(1-2):101-10.

61. **Coussens PM. 2004.** Model for Immune Responses to *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Cattle. *Infect Immun* 72(6): 3089-3096.

62. **Dabo SM, Confer AW y Hartson SD. 2005.** Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Vet Microbiol* 110: 265–275.

63. **Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. 2008.** *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews* 8(2); 129–150

64. **D'Alterio GL, Knowles TG, Eknaes EI, Loevland IE, Foster AP. 2006.** Postal survey of the population of South American camelids in the United Kingdom in 2000/01. *Vet Rec* 158: 86- 90.

65. **Dar PA, Hajam IA, Suryanarayana VS, Kishore S, Kondabattula G. 2015.** Kinetics of cytokine expression in bovine PBMMCs and whole blood after *in vitro* stimulation with foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Cytokine* 72(1):58-62.

66. **Davey E, Greicius G, Thyberg J, Severinson E. 2000.** STAT6 is required for the regulation of IL-4 induced cytoskeletal events in B cells. *International Immunology* 12(7): 995-1003.

67. **Davis R, Keeble E, Wright A, Morgan KL. 1998.** South American camelids in the United Kingdom: population statistics, mortality rates and causes of death. *Vet Res* 142: 162-166.

68. **De Ley J, Mannheim W, Mutters R, Piechulla K, Tytgat R, Segers, P, Bisgaard M, Frederiksen W, Hinz KH, y Vanhoucke M. 1990.** Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 40, 126-137.

69. **Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, y Fraser GJ. 1992.** Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J Bacteriol* 174, 2002-2013.

70. **Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, y Fraser GJ. 1993.** Phylogeny of the *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. *Zentralbl Bakteriol* 279, 35-44.

71. **Doughty SW, Ruffolo CG y Adler B. 2000.** The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida. Vet Microbiol* 72: 79–90.

72. **Dziva F, Christensen H, Olsen JE y Mohan K. 2001.** Random amplification of polymorphic DNA and phenotypic typing of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 82, 361-372.

73. **El-Boshy M, Abbas H, El-Khodery, Osman S. 2009.** Cytokine response and clinicopathological findings in Brucella infected camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinarni Medicina* 54(1): 25–32.

74. **Erdogan S., Celik S., Aslantas O., Kontas T., Ocak S. 2007.** Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis* induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. *Research in Veterinary Science* 82: 181–186.

75. **FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación). 2005.** Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en el Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y

aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914.

76. **Fegan N, Blackall PJ y Pahoff, JL. 1995.** Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Vet Microbiol* 47, 281-286.

77. **Fernandez de Henestrosa AR, Badiola I, Saco M, Perez de Rozas AM, Campoy S &y Barbe J. 1997.** Importance of the galE gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol Lett* 154: 311–316.

78. **Foged NT, Pedersen KB y Elling F. 1987.** Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS *Microbiol Lett* 43: 45–51.

79. **Fuller TE, Kennedy MJ y Lowery DE. 2000.** Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb Pathog* 29: 25–38.

80. **Gabrielli S, Ortolani C, Del Zotto G, Luchetti F, Canonico B, Bucella F, Artico M, Papa S, Zamai L. 2016.** The Memories of NK Cells: Innate-Adaptetive Immune Intrinsic Crosstalk. *Journal of Immunology Research.* Vol 2016, Article ID1376595, 14p.

81. **Galliot O, Lemenand O, Marceau M, Simonet M. 2013.** Proposed reclassification pf *Pasteurella lymphangitidis* Senath & Stevens 1990 as *Yersinia pseudotuberculosis. Int J Syst Evol Microbiol.* 63(Pt 10):3927-9.

82. **Ganfield DJ, Rebers PA y Heddleston. 1976.** Immunogenic and toxic properties of a purified lipopolysaccharide-protein complex from *Pasteurella multocida. Infect Immun* 14: 990–999.

83. **García N. 2010.** Caracterización Fenotípica y genética de Aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. Memoria para optar al grado de Doctor. Univrsidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. 190p.

84. **Garmendia A, Palmer G, De Martini J, McGuire T. 1986.** Failure of passive immunoglobulin transfer: A major determinant of mortality in newborn alpacas (lama pacos). *Am J Vet Res* Vol 48, Nº 10.

85. Garnica J, Bravo W. 2001. Absorción de inmunoglobulina G calostral en alpacas crías durante la vida perinatal. ALLPAK'A Revista de investigación sobre camélidos sudamericanos. Vol. 9 – Nº 1. Puno Perú.

86. Garrido ME, Bosch M, Bigas A, Badiola I, Barbé J, Llagostera M. 2008. Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida* fur ompH. *Int Microbiol* 11(1):17-24.

87. Gillan S, Brien RO, Hughes AD, Griffin JFT. 2010. Identification of Immune Parameters to Differentiate Disease States among Sheep Infected with *Mycobacterium avium. Clinical and vaccine immunology* 17(1):108-117.

88. Givan AL. 2011. Flow Cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 699:1-29

89. Glisson JR, Contreras MD, Cheng IHN y Wang C. 1993. Crossprotection studies with *Pasteurella multocida* bacterins prepared from bacteria propagated in iron-depleted medium. *Avian Dis* 37: 1074–1079.

90. Glorioso JC, Jones GW, Rush HG, Pentler LJ, Darif CA y Coward JE. 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect Immun* 35: 1103–1109.

91. Goldsby R, Kindt T, Kuby J, Osborne B. 202. Immunology, Fifth Edition. Published By W.H: Fremman.

92. Grandi G y ebrary Inc. 2004. Genomics, proteomics, and vaccines, en ebrary Electronic Books. Wiley: Chichester; Hoboken, NJ. p. xxi, 313 p.

93. Guo L, Urban JF, Zhu J, William E. 2002. Elevating Calcium in Th2 Cells Activates Multiple Pathways to Induce IL-4 Transcription and mRNA Stabilization. *The Journal of Immunology* 181: 3984-3993.

94. Guzmán K, Rosadio R, Maturrano L, Manchego A. 2013. Asociación de agentes virales y bacterianos en cuadros de neumonías agudas en alpacas tuis. *Rev Inv Vet Perú* 24(4): 524-536.

95. Guzmán KP. 2011. Identificación de polimorfismos del gen tlr4 en crias de alpacas con cuadros de neumonías por *Pasteurella multocida.* Tesis

para optar por el título de médico veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.

96. **Hall W J, Heddleston KL, Legenhausen DH y Hughes RW. 1955.** Studies on pasteurellosis. I. A new species of *Pasteurella* encountered in chronic fowl cholera. *Am J Vet Res* 16, 598-604.

97. **Hamerman JA, Oqasawara K, Lainer LL. 2005.** *Curr Opin Immunol* 17(1):29-35.

98. **Hansen LM y Hirsh DC. 1989.** Serum resistance is correlated with encapsulation of avian strains of *Pasteurella multocida. Vet Microbiol* 21: 177–184.

99. **Harmon BG, Glisson JR, Latimer KS, Steffens WL y Nunnally JC 1991.** Resistance of Pasteurella multocida A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. *Am J Vet Res* 52: 1507–1511.

100. **Harper M, Boyce JD, Wilkie IW y Adler B. 2003.** Signaturetagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. *Infect Immun* 71: 5440–5446.

101. **Harper M, Cox AD, St Michael F, Wilkie IW, Boyce JD y Adler B. 2004.** A heptosyltransferase mutant of Pasteurella multocida produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. *Infect Immun* 72: 3436–3443.

102. **Harper M, Boyce JD, Adler B. 2006.** *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 265(1):1-10.

103. **Harper M, Cox A, Adler B, Boyce J. 2011.** *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide: The long and the short of it. *Veterinary Microbiology* 153: 109-115.

104. **Harper M, John M, Turni C, Edmunds M, St Michael F, Adler B, Blackall PJ, Cox AD, Boyce JD. 2015.** Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J Clin Microbiol* 53(2):477-85. doi: 10.1128/JCM.02824-14.

105. Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida. Vet Microbiol* 29;144(1-2):1-17. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.027.

106. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Ywakura Y, Mukaida N, Kondo T. 2007. IFN-γ Protects Cerulein-Induced Acute Pancreatitis by Repressing NF- Kβ Activation 1. *The Journal of Immunology* 178 (17): 7385-7394.

107. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping Pasteruella multocida from avian species. *Avian Dis* 16(4):925-36.

108. Heddleston KL. 1976. Physiologic characteristics of 1,268 cultures of *Pasteurella multocida. Am J Vet Res* 37, 745-747.

109. Herráez A. 2012. Biología molecular e ingeniería genética. 2da edición. *Elsevier España* 22, 536 pages.

110. Hirsh D C, Jessup DA, Snipes KP, Carpenter TE, Hird DW y McCapes, RH. 1990. Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from waterfowl and associated avian species in California. *J Wildl Dis* 26, 204-209.

111. Horadagoda N, Hodgson J, Moon G, Wijewardana T & Eckersall P. 2002. Development of a clinical syndrome resembling haemorragic septicaemia in the buffalo following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B:2 endotoxin and the role of tumour necrosis factor-alpha. *Res Vet Sci* 72: 194-200.

112. Huber JP, Ramos HJ, Gill M, Farrar JD. 2010. Cutting edge: Type I IFN reverses human Th2 commitment and stability by suppressing GATA3. *Journal of immunology* 185(2):813-817.

113. Hueppe F. 1886. Ueber die Wildseucine und ihre Bedeutung für die Nationalökonomie und die Hygiene. *Berliner Klinische Wochenschrift* 44, 753- 758.

114. Isaacson RE y Trigo E. 1995. Pili of *Pasteurella multocida* of porcine origin. FEMS *Microbiol Lett* 132: 247–251.

115. INEI. 2012. IV Censo Nacional Agropecuario. Diciembre. Punto & Grafía.

116. Jawetz E. 1950. A pneumotropic pasteurella of laboratory animals; bacteriological and serological characteristics of the organism. *J Infect Dis* 86, 172-183.

117. Jones DM. 1962. A pasteurella-like organism from the human respiratory tract. *J Pathol Bacteriol* 83, 143-151.

118. Kachlany SC, Planet PJ, DeSalle R, Fine DH y Figurski DH. 2001. Genes for tight adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans: from plaque to plague to pond scum. *Trends Microbiol* 9: 429–437.

119. Kachlany SC, Planet PJ, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH y Kaplan JB. 2001b. Flp-1, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* 40: 542–554.

120. Kalies K, König P, Zhang Y-ming, Deierling M, Barthelman J, Stamm C, Westermann J. 2008. Nonoverlapping Expression of IL10, IL12p40, and IFN mRNA in the Marginal Zone and T Cell Zone of the Spleen after Antigenic Stimulation. *The Journal of Immunology* 180: 5457–5465.

121. Kamalakannan V, Kirthika S, Haripriya K, Babu S and Narayanan RB. 2012. *Wolbachia* heat shock protein 60 induces pro-inflamatory cytokines and apoptosis in monocytes in vitro. *Microbes Infect* 14(7-8): 610-618.

122. Kasten RW, Hansen LM, Hinojoza J, Bieber D, Ruehl WW, Hirsh DC. 1995. *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 63(3):989-93.

123. Kedrak A, Borkowska-Opacka B. 2003. Immunological response to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype A: 3 in calves. *Bull Vet Inst Pulawy* 47:387–394.

124. Kennett L, Muniandy N y Mukkur TKS. 1993. Comparative Protective Potential of Non-living Intact Cells and Purified Outer Membrane and Associated Proteins of *Pasteurella multocida* Type B:6 Grown Under Iron-Regulated Conditions. In: Pasteurellosis in Production Animals, ACIAR Proceedings No. 43 (Patten BEea, ed.), pp. 144–149. ACIAR Press, Canberra.

125. Kharb S1, Charan S. 2010. Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of Pasteurella multocida B:2 in mice model. *Indian J Exp Biol* 48(12):1181-7.

126. Kilian M. y Frederiksen W. 1981. Identification tables for the *Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus* group. In *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. W.Frederiksen and E.L.Biberstein (eds.). Academic Press, London. 281-290.

127. Kimura A, Mountzouros KT, Relman DA, Falkow S y Cowell JL. 1990. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* 58: 7–16.

128. Kitt TH. 1893. Bakterienkunde und Pathologische Mikroskopie 304.

129. Koller FL, Hwang DG, Dozier EA, Fingleton B. 2010. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis* 1(6):1010-1017.

130. Koneman EW, Stephen DA, Williams MJ, y Schrenberger PG. 1999. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 388-461.

131. Korbel R, Gerlach H, Bisgaard M y Hafez HM. 1992. Further investigations on *Pasteurella multocida* infections in feral birds injured by cats. *Zentralbl Veterinarmed* B 39, 10-18.

132. Krause T, Bertschinger HU, Corboz L y Mutters R. 1987. V-factor dependent strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida*. Zentralbl *Bakteriol MikrobiolHyg* (A)266, 255-260.

133. Kuhnert P y Korczak BM. 2006. Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family *Pasteurellaceae* by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology* 152, 2537-2548.

134. Kuhnert P, Boerlin P, Emler S, Krawinkler M, y Frey J. 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. *Int J Med Microbiol* 290, 599-604.

135. **Kurreeman FS, Schonkeren JM, Heijmans BT, Toes REM, Huizinga TWJ. 2004.** Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. *Human molecular genetics* 13(16):1755-1762.

136. **Lainson FA, Harkins DC, Wilson CF, Sutherland AD, Murray JE, Donachie W, Baird GD. 1991**. Identification and localization of an iron-regulated 35 kDa protein of *Pasteurella haemolytica* serotype A2. *J Gen Microbiol* 137(2):219-26.

137. **Lashkarbolouki T, Ardestani S, Kariminia A, Ziaee A, Torkabadi E, Ebrahimi M. 2005.** Kinetics study of cytokines production by human peripheral blood mononuclear cells in response to *Brucella* DNA. *Microbiol Res* 163:466-472.

138. **Lax AJ y Chanter N. 1990.** Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. *J Gen Microbiol* 136: 81–87.

139. **Lee J, Kim YB, Kwon M. 2007.** Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. *J Microbiol* 45(2):179-84.

140. **Lehmann KB y Neumann R. 1899.** Lehmann's Medizin, Handatlanten Band X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 2, 196.

141. **Ligniéres JM. 1990.** Contribution à létude et à la classification des septicèmies hémorrhagique. Les Pasteurelloses. *Ann Inst Pasteure* 15, 734-736.

142. **Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.

143. **Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont H, Nanthakumar NN, Estrada García T. 2010.** Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infection and immunity* 78(3): 1221-8.

144. **Lu Y, Sarson AJ, Gong J, Zhou H, Zhu W, Kang Z, Yu H, Sharif S, Han Y. 2009.** Expression profiles of genes in Toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. *Clinical and vaccine immunology* 16(11):1639-1647.

145. **Lu YS, Afendis SJ y Pakes SP. 1988.** Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* 3:A in rabbits. *Infect Immun* 56: 1532–1537

146. **Lu YS, Lai WC, Pa kes SP and Nie LC. 1991.** A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurellosis. *Infect Immun* 59:172- 80.

147. **Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, Karp CL, Aliberti J, Flick MJ, Jordan MB 2010.** Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. *J Immunol* 184:877–885 10.4049/jimmunol.0902346.

148. **Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. 2002.** CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R Deficient Mice_: Implications for the Nonredundant Function of IL-2. *Autoimmunity*. 17:167-178.

149. **Mamani P, Condemayta C, Calle C. 2009.** Causas de mortalidad de alpacas en tres principales centros de producción ubicados en puna seca y húmeda del departamento de puno. *Red Vet* 10 (8): 13P.

150. **Mannheim W, Pohl S, y Hollander R. 1980.** [On the taxonomy of *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*: DNA base composition, respiratory quinones, and biochemical reactions of representative collection cultures (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol* A 246, 512-540.

151. **Mannheim W and Carter G. 1984.** In bergey's Manual of Systematic Bacteriology. NR. KRIEG and J.G. Holt (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 1, 550-558.

152. **Martins GA, Cimmino L, Liao J, Magnusdottir E, Calame K. 2008.** Blimp-1 directly represses IL-2 and the IL-2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival. *The Journal of experimental medicine* 205(9):1959-65.

153. **May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS & Kapur V. 2001.** Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci* USA 98: 3460–3465.

154. **Maynard CL, Hatton RD, Helms WS, Oliver JR, Stephensen CB, Weaver CT. 2009.** Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206(2):343-357.

155. **McKarns SC, Schwartz RH. 2008.** Biphasic regulation of IL2 transcription in CD4+ T Cells: Roles for TNF-α Receptor Signaling and Chromatin Structure. *The Journal of Immunology* 181: 1272-1281.

156. **Mead J, Hughes T, Irvine S, Singh N, Reamji D. 2003.** Interferon-γ stimulates the expression of the inducible cAMP early repressor in macrophages through the activation of casein kinase 2. *The Journal of Biological Chemistry* 278(20): 17741-17751.

157. **Meijssen MAC, Brandwein SL, Reinecker HC, Bhan AK, Podolsky DK. 1998.** Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice splice forms Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274:472-479.

158. **Mendes S, Carmichael KP, Nunnally JC, Glisson JR, Cheng IH &y Harmon BG. 1994.** Lesions resulting from attempted Shwartzman reaction in turkey poults inoculated with *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide. *Avian Dis* 38: 790–796.

159. **Mietzner TA, Barnes RC, JeanLouis YA, Shafer WM, Morse SA. 1986.** Distribution of an antigenically related iron-regulated protein among the *Neisseria spp*. *Infect Immun* (1):60-8.

160. **Mine T, Sato Y Nasanori N, Sasatomi T, Gouhara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K y Yamana H. 2004.** Humoral Responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clinical Cancer Research* Vol. 10,929-937, February I.

161. Mohan K, Sadza M, Madsen M, Hill FW y Pawandiwa A. 1994. Phenotypic characterization of Zimbabwean isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 38, 351-357.

162. Montenegro J, Sandoval N, Chavea A, Manchego S. 2006. Caracterización Histológica del Timo en Fetos de Alpaca. *Rev Inv Vet Peru* 17(1): 26-32.

163. Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, van der Heide HG, Walvoort HC y Guinee PA. 1992. Construction and analysis of Bordetella pertussis mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog* 12: 127–135.

164. More JA. 2010. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (α y β defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca. Tesis para optar por el título de médico veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.

165. More JA. 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 para optar por el título de Magister en Ciencias Veterinarias, mención Salud Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.

166. Muhairwa AP, Mtambo MM, Christensen JP y Bisgaard M. 2001. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Vet Microbiol* 78, 139-153.

167. Mullan PB y Lax AJ. 1998. *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 63: 340–345.

168. Murphy AC y Rozengurt E. 1992. *Pasteurella multocida* toxin selectively facilitates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by bombesin, vasopressin, and endothelin. Requirement for a functional G protein. *J Biol Chem* 267: 25296–25303.

169. **Mutters R, Ihm P, Pohl W, Frederiksen W, y Mannheim W. 1985.** Reclassification of the genus *Pasteurella Trevisan* 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol* 35, 309-322.

170. **Mutters R, Piechulla K, Hinz KH y Mannheim W. 1985b.** Pasteurella avium (Hinz and Kunjara 1977) comb. nov. and Pasteurella volantium sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 35, 5-9.

171. **Mutters R, Pohl S y Mannheim W. 1986.** A *Pasteurella*-like organism drom the human respiratory tract. *J Pathol Bacteriol* 83, 143-51.

172. **Neurath M, Weigman B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis R, Iijima H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mudter J, Galle P. 2002.** The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 1995:1129-1143.

173. **Oda M, Kihara A, Yoshioka H, Saito Y, Watanabe N, Uoo K, Higashihara M, Nagahama M, Koide N, Yokoshi T, Sakurai J. 2008.** Effect of Erythromycin on Biological Activities Induced by *Clostridium perfringens* α-Toxins. Ph*armacology and Experimental Therapy* 327(3):934-940.

174. **Odbileg R, Lee S, Yoshida R, Chang KS, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 2004.** Cloning and sequence analysis of llama cytokines related to cell-mediated immunity. Veterinary Immunology and Immunopathology 99 (1-2): 1-10.

175. **Odbileg R, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2005a**. Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of Camelidae. J Vet Med Sci 67(9):921-5.

176. **Odbileg R, Lee SI, Ohashi K, Onuma M. 2005b**. Cloning and sequence analysis of llama (lama glama) Th2 (IL-4, IL-10 and IL-13) cytokines. Vet Immunol Immunopathol 104(3-4):145-53.

177. **Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2006.** Complete cDNA Sequences and Phylogenetic Analysis of the

Th1 and Th2 Cytokines of the Bactrian Camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Veterinary Medical Science* 68(9):941-946.

178. **Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z, Erdenebaatar J, Konnai S, Onuma M and Ohashi K. 2008.** Cytokine responses in camels (Camelus bactrianus) vaccinated with Brucella abortus strain 19 vaccine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 70(2):197-201.
179. **Olsen I, Dewhirst FE, Paster BJ, y Busse HJ. 2005.** Family I. Pasteurellaceae Pohl 1981b, 382 VP. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology.D.J.Brenner, N.R.Krieg, J.T.Staley and G.M.Garrity (eds.).Michigan State University.East Lausing, USA. 2, 851-856.
180. **Opal SM, Depalo VA. 2000.** Anti – inflammatory cytokines. *Chest* 117: 1162-1172.
181. **Patil A., Hughes A., Zhang G. 2004.** Rapid evolution and diversification of mammalian α-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 20: 1-11.
182. **Pedersen K, Dietz HH, Jorgensen JC, Christensen TK, Bregnballe T y Andersen TH. 2003.** *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. *J Wildl Dis* 39, 808-816.
183. **Petersen KD, Christensen H, Bisgaard M, y Olsen JE. 2001.** Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial atpD sequence comparisons. *Microbiology* 147, 2739-2748.
184. **Petersen KD, Christensen JP, y Bisgaard M. 1998**. Phenotypic and genotypic diversity of organisms previously classified as maltose positive *Pasteurella multocida*. *Zentralbl Bakteriol* 288, 1-12.
185. **Petersen SK, Foged NT, Bording A, Nielsen JP, Riemann HK y Frandsen PL. 1991.** Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect Immun* 59: 1387–1393.
186. **Pfaffl M. 2001**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 1; 29(9): e45.

187. **Piojan P, Aguilar F, Morales F. 1999.** Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Mex* 30 (2): 149-155.

188. **Pohl S. 1981.** DNA relatedness among members of Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. In Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. M.Kilian, W. Frederiksen and E.L. Biberstein (eds.). *Academic Press, London, United Kingdom*. 245-253.

189. **Prado ME, Dabo SM y Confer AW. 2005.** Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein. Vet Microbiol 25;105(3-4):269-80.

190. **Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR y Brogden KA. 1996.** Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Dis* 40: 887–893.

191. **Pullinger GD, Bevir T y Lax AJ. 2004.** The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol Microbiol* 51: 255–269.

192. **Quispe W, 2009.** Determinación del tiempo de producción de IgG en crías de alpacas. Tesis para optar por el Título Profesional**.** Universidad Jorge Basadre-Tacna.

193. **Ramdani &y Adler B. 1991.** Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS in immunity. *Vet Microbiol* 26: 335–347.

194. **Ramirez A, 1987.** Alpaca Clostridium perfringens type A enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin. In partial fulfillment of the requirements for the degree if Doctor of Philosophy. Colorado State University. Colorado. 201p.

195. **Reader R, Hyde D, Schelegle E, Aldrich M, Stoddard A, McLane M, Levitt R, Tepper J. 2003.** Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation. *Am J Respir Cell- Mol Biol* 28,664-672.

196. **Rebers PA, Jensen AE y Laird GA. 1988.** Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of Pasteurella multocida. Avian Dis 32: 313–318.

197. Rhoades KR y Rimler RB. 1984. Avian Pasteurellosis. In: Diseases of Poultry 8th edn (Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM & Yoder HW Jr, eds), pp. 141–156. Iowa State University Press, Ames, IA.

198. Rimler RB y Glisson JR. 1997. Fowl cholera. In Diseases of Poultry.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (eds.). Ames, Iowa State University Press. 143-159.

199. Rimler RB y Rhoades KR. 1994. Hyaluronidase and chondroitinase activity of *Pasteurella multocida* serotype B:2 involved in hemorrhagic septicaemia. *Vet Rec* 134: 67–68.

200. Rosadio R, Ameghino E, Ramírez A. 1990. Diagnosis and control of diseases in sheep and alpaca in Peru. En: Improving Andean sheep and alpaca production. Mc Corkle CM (Ed). University of Missoury-Columbia Printing Services, pp 141-220.

201. Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. 2011. Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with Pasteurella multocida and Mannheimia hemolytica in acute pneumonias of neonatal alpacas. Small Ruminant Res doi: 10.1016.

202. Rosenbusch CT y Merchant IA. 1939. A Study of the Hemorrhagic Septicemia Pasteurellae. *J Bacteriol* 37, 69-89.

203. Ruffolo CG, Jost BH y Adler B. 1998. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet Microbiol* 59: 123–137.

204. Ruffolo CG, Tennent JM, Michalski WP y Adler B. 1997. Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida. Infect Immun* 65: 339–343.

205. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. 2009. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 136:1182–1197.

206. Schlater LK, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Moss CW, Lambert MA y Packer RA. 1989. *Pasteurella caballi*, a new species from equine clinical specimens. *J Clin. Microbiol* 27, 2169-2174.

207. Schroder K, Hertzog P, Ravasi T, Hume D. 2004. Interferon-γ: an overview of signals, mechanism and functions. *J* Leukoc *Biol* 75: 163-189.

208. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3 (+) CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells by interleukin IL-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *JEM* 201(5): 723- 735.

209. Shah SM , Kumar R, Brah GS, Santra L, and Pawar H. 2012. Differential Expression of Th1- and Th2- Type Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Murrah Buffalo (*Bubalus Bubalis*) on TLR2 Induction by *B. Subtilis* Peptidoglycan. *Asian-Australas J Anim Sci* 25(7): 1021–1028.

210. Sharpe MS, Lord LK, Wittum TE, Anderson DE. 2009. Pre-weaning morbidity and mortality of llamas and alpacas. *Aust Vet J* 87: 56-60.

211. Shivachandra S, Kumar A, Mohanty N and Yogisharadhya R. 2017. Immunogenicity of recombinant Omp16 protein of *Pasteurella multocida* B:2 in mouse model. *Indian Journal of Animal Sciences* 87(1):29-34.

212. Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G. 2004. Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice. *J Leukoc Biol* 76: 782- 786.

213. Skerman VBD, McGowan V y Sneath PH. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* 30, 225-420.

214. Sneath PH. y Stevens M. 1990. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40, 148-153.

215. Sneath PH. 1992. Correction of orthography of epithets in *Pasteurella* and some problems with recommendations on latinization. *Int J Syst Bacteriol* 42, 658-659.

216. Snipes KP y Biberstein EL. 1982. *Pasteurella testudinis* sp. nov.: a parasite of desert tortoises (*Gopherus agassizi*). *Int J Syst Bacteriol* 32, 201-210.

217. Snipes KP y Hirsh. 1986. Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Avian Dis* 30, 500-504.

218. Snipes KP, Hansen LM y Hirsh DC. 1988. Plasma- and ironregulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida. Am J Vet Res* 49: 1336–1338.

219. Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Carpenter TE, Hird DW y McCapes RH. 1990. Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California, 1985-88. *Avian Dis* 34, 315-320.

220. Sterner-Kock A, Lanske B, Uberschar S y Atkinson MJ. 1995. Effects of the *Pasteurella multocida* toxin on osteoblastic cells in vitro. *Vet Pathol* 32: 274–279.

221. Sthitmatee N, Numee S, Kawamoto E, Sasaki H, Yamashita K, Takahashi N, Kataoka Y, Sawada T. 2008. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida. Vaccine* 2;26(19):2398-407. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.02.051.

222. Stirnweiss A, Ksienzyk A, Klages K, Rand U, Grashoff M, Hauser H, Kroger A. 2010. IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction. *Journal of immunology* 184(9): 5179-5185**.**

223. Svoboda KH, Pohl S, y Mannheim W. 1981. [Investigations on the phylogeny of *Pasteurella multocida*: DNA base sequence relatedness among strains representing Carter's serogroups A through E, and elimination of biovar 6 (socalled dog-type strains) (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol* A 248, 494-501.

224. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. México: Investigación en discapacidad 2: 70-78.

225. Tatum FM, Yersin AG y Briggs RE. 2005. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* fhab2 mutant in turkeys. *Microb Pathog* 39: 9–17.

226. Tau G, Von der Weid T, Lu B, Cowan S, Kvatyuk M, Pernis A, Cattoretti G, Braunstein N, Coffman R, Rothman P. 2000. Interferon γ

Signaling Alter the Function of T Heper Type 1 Cells. *J Exp Med* 192(7): 977-986.

227. Thomas RM, Chunder N, Chen C, Umetsu SE, Winandy S, Wells AD. 2007. Ikaros Enforces the Costimulatory Requirement for IL2 Gene Expression and Is Required for Anergy Induction in CD4+ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 179: 7305–7315.

228. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. 2004. Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4 + CD25 + T Cell Suppressor Function. *J Immunol* 172: 6519-652.

229. Tizard I, 2013. Veterinary Immunology, 9th edition**.** *Editorial Elsevier*. 20-21, 170-180, 223-245.

230. To H, Someno S y Nagai S. 2005. Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Am J Vet Res* 66: 113–118.

231. Topley WWC y Wilson GS. 1929. The Principles of Bacterology and Immunity.Edward Arnold & Co. London. 488.

232. Trevisan V. 1887. Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha constratta l'infezione rabbica. *Rend R 1st Lomb Sci Let* 20, 88-94.

233. Truscott WM y Hirsh DC. 1988. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. *Infect Immun* 56: 1538–1544.

234. Tykocinski LO, Hajkova P, Chang HD, Stamm T, Sozeri O, Lohning M, Hu-Li J, Niesner U, Kreher S, Friedrich B, Pannetier C, Grutz G, Walter J, Paul WE, Radbruch A. 2005. A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 28177–28185.

235. Varga Z, Sellyei B y Magyar T. 2007. Phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Hungary. *Acta Vet Hung* 55, 425-434.

236. Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri, Zitvogel, Lainer L, Yokohama W, ugolini S. 2011. Innate or Adaptative Immunity? The Example of NaturaL Killer Cells. *Science* 7;331(3013): 44-49.

237. Wagner B, Burton A, Ainsworth D. 2010. Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet Res* 41(4): 41-47.

238. Wakil A, Wang Z, Ryan J, Fowell D, Locksley R. 1998. Interferon γ derived from CD4+ T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *J Exp Med* 188(9): 1651-1656.

239. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, y Hooper DC. 1984. Pasteurella multocida infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine* (Baltimore) 63, 133-154.

240. Wernery U, 2001. Camelid immunoglobulin and their important for the new-born – a review *J Vet Med* B 48:561-568.

241. Wheeler CJ. 1995. Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biol J Linnean Soc* 54, 271–295.

242. Wijewardana TG, Wilson CF, Gilmour NJ y Poxton IR. 1990. Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective anti-lipopolysaccharide antibody. *J Med Microbiol* 33: 217–222.

243. Wilson BA, Zhu X, Ho M &y Lu L. 1997. *Pasteurella multocida* toxin activates the inositol triphosphate signaling pathway in Xenopus oocytes via G(q)alpha-coupled phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* 272: 1268–1275.

244. Wright A, Davis R, Keeble E, Morgan KL. 1998. South American camelids in the United Kingdom: reproductive failure, pregnancy diagnosis and neonatal care. 142: 214-215.

245. Xin J, Ohmori K, Nishida J, Zhu Y, Huang H. 2007. The initial response of CD4+ IL-4 producing cells. *International Immunology* 19(3):205-310.

246. Yates WD. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Compo Med* 46:225~263.

247. Yoo H, Maheswaran SK, Lin G, Townsend EL, Ames TR. 1995. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with Pasteurella haemolytica lipopolysaccharide. *Infect Immun* 63(2):381-8.

248. Zhang H, Ainsworth AJ, Montgomery RD. 1994. Use of a 35.5 kDa cell membrane composition of *Pasteurella multocida* and an anti-idiotype antibody to induce protective immunity in leghorn chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 41:89–100.

249. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Horwitz DA. 2004. Natural and Induced CD4 + CD25 + Cells Educate CD4 + CD25 – Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β, and IL-10. *The Journal of Immunology* 172: 5213-5221.

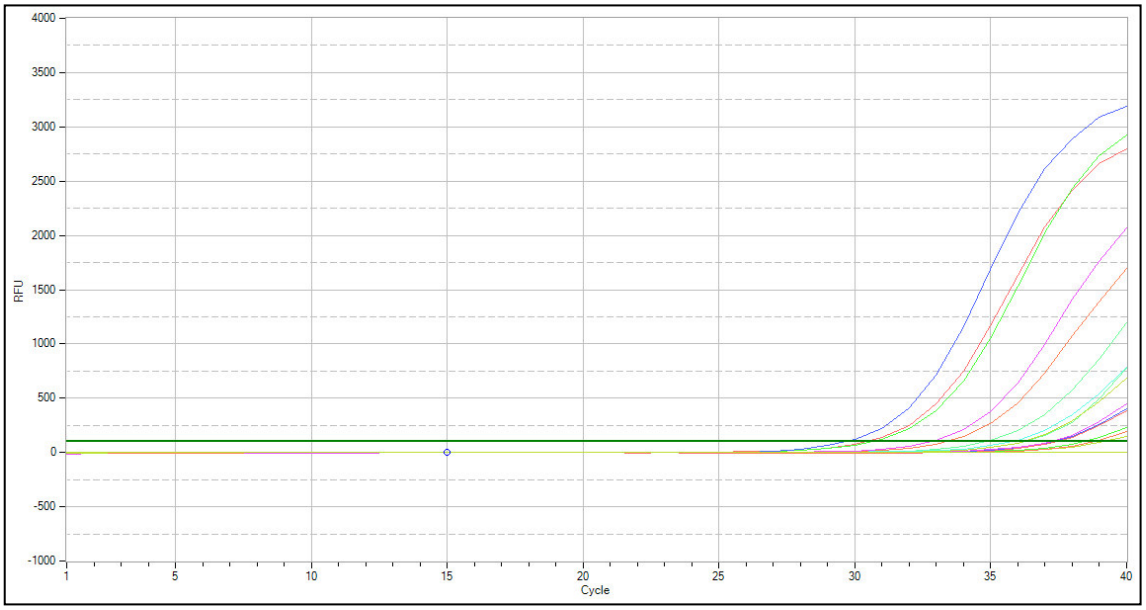
250. Zywietz A, Gohla A, Schmelz M, Schultz G y Offermanns S. 2001. Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and –independent mechanisms. Involvement of Gq but not G11. *J Biol Chem* 276: 3840–3845.

X. APÉNDICE

Anexo 1. Cuadro de valores de Cq de las muestras utilizadas para estandarización de GAPDH.

Well	Sample Type	Name	Cq
A01-Ch5	Reference Gene	A1	24.25
A02-Ch5	Reference Gene	A2	26.16
A03-Ch5	Reference Gene	A3	31.65
A04-Ch5	Reference Gene	A4	30.23
A05-Ch5	Reference Gene	A5	31.25
B01-Ch5	Reference Gene	B1	24.19
B02-Ch5	Reference Gene	B2	29.75
B03-Ch5	Reference Gene	B3	29.33
B04-Ch5	Reference Gene	B4	30.08
B05-Ch5	Reference Gene	B5	27.77
C01-Ch5	Reference Gene	C1	22.36
C02-Ch5	Reference Gene	C2	25.28
C03-Ch5	Reference Gene	C3	33.19
C04-Ch5	Reference Gene	C4	33.16
C05-Ch5	Reference Gene	C5	29

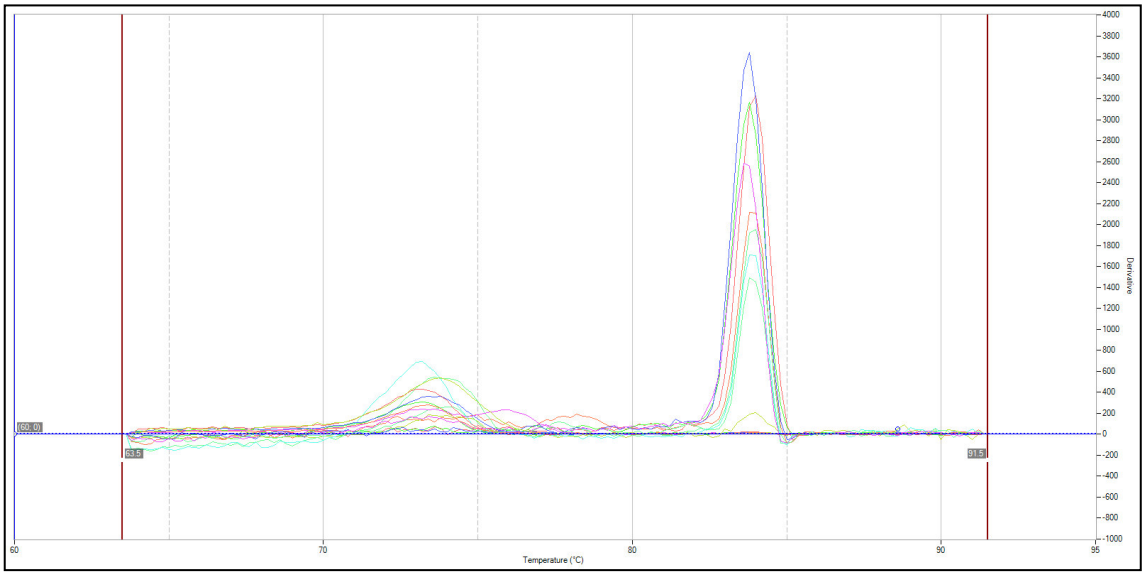
Anexo 2. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de GAPDH



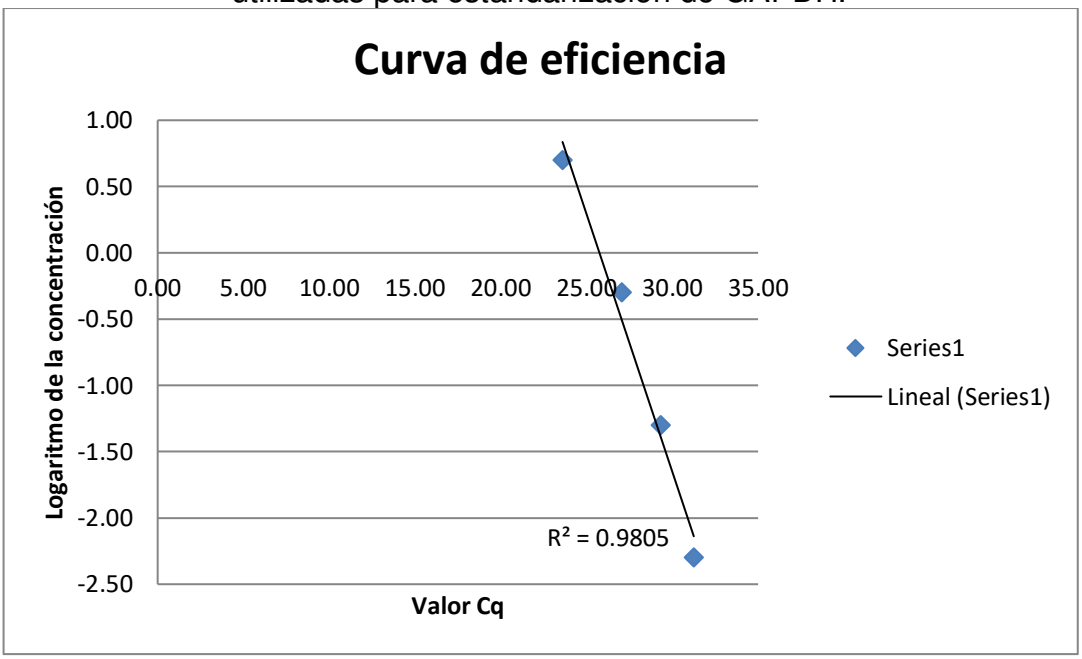
Anexo 3. . Cuadro de valores de temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de GAPDH

Well	Sample Type	Sample Name	Melt Temp
A01-Ch5	Reference Gene	1.1	83.61
A02-Ch5	Reference Gene	1.2	83.16
A03-Ch5	Reference Gene	1.3	83.31
A04-Ch5	Reference Gene	1.4	72.87
A05-Ch5	Reference Gene	1.5	74.5999999999998
B01-Ch5	Reference Gene	2.1	83.45
B02-Ch5	Reference Gene	2.2	81.13
B03-Ch5	Reference Gene	2.3	72.4900000000001
B04-Ch5	Reference Gene	2.4	89.44
B05-Ch5	Reference Gene	2.5	72.6899999999999
C01-Ch5	Reference Gene	3.1	83.39
C02-Ch5	Reference Gene	3.2	83.13
C03-Ch5	Reference Gene	3.3	83.07
C04-Ch5	Reference Gene	3.4	89.39
C05-Ch5	Reference Gene	3.5	72.75

Anexo 4. Curva de temperatura de melt para GAPDH de las 15 diluciones evaluadas.



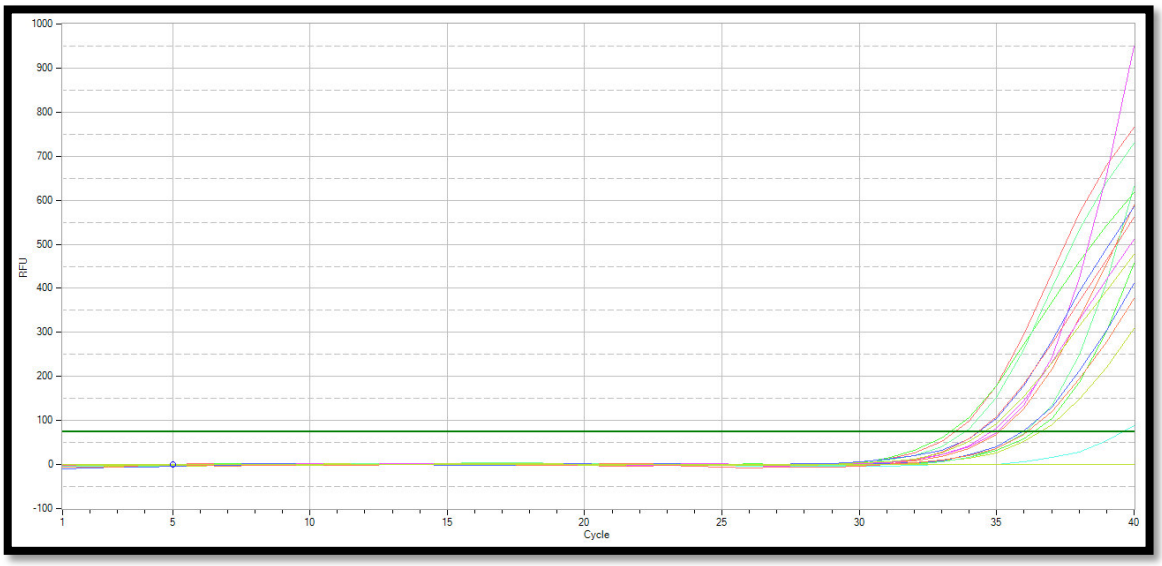
Anexo 5. Curva de eficiencia Cq vs Log de la concentración de las 15 muestras utilizadas para estandarización de GAPDH.



Anexo 6. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de TNF-α

Well	Sample Type	Sample Name	Cq
A01-Ch5	Reference Gene	A1	33.49
A02-Ch5	Reference Gene	A2	35.11
A03-Ch5	Reference Gene	A3	36.59
A04-Ch5	Reference Gene	A4	36.37
A05-Ch5	Reference Gene	A5	36.08
B01-Ch5	Reference Gene	B1	33.33
B02-Ch5	Reference Gene	B2	33.86
B03-Ch5	Reference Gene	B3	39.62
B04-Ch5	Reference Gene	B4	35.99
B05-Ch5	Reference Gene	B5	35.04
C01-Ch5	Reference Gene	C1	34.36
C02-Ch5	Reference Gene	C2	34.83
C03-Ch5	Reference Gene	C3	34.33
C04-Ch5	Reference Gene	C4	36.13
C05-Ch5	Reference Gene	C5	34.56

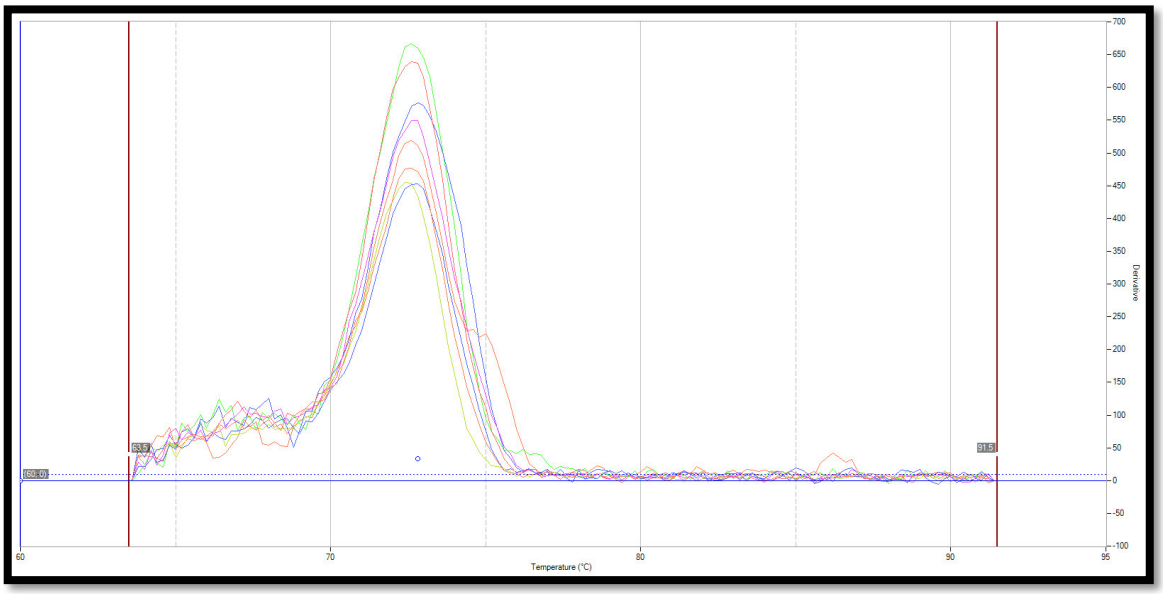
Anexo 7. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de TNF-α.



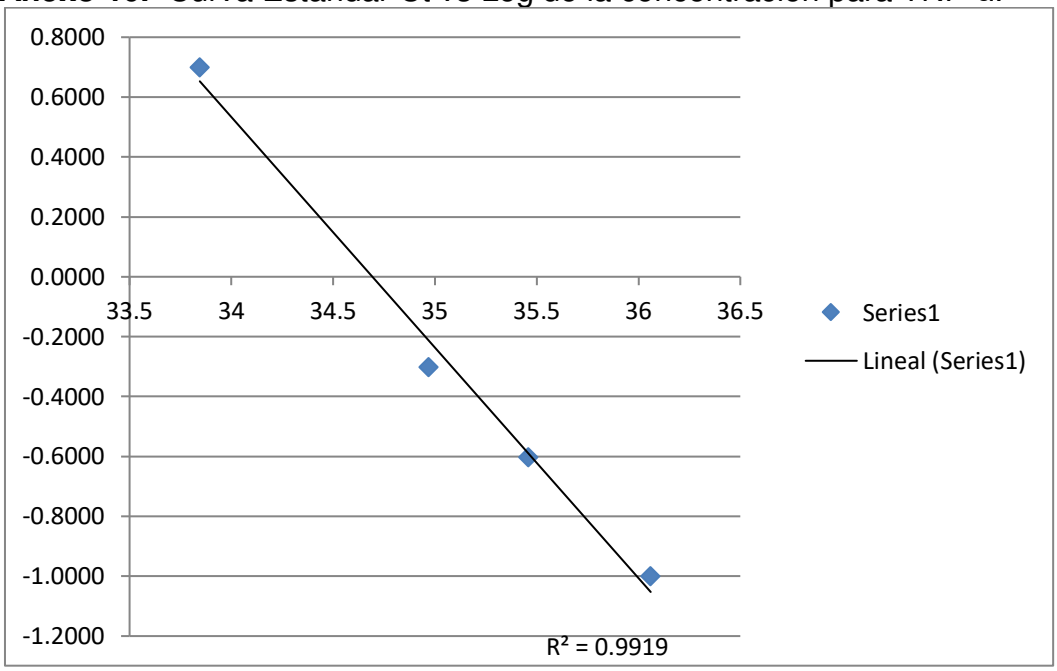
Anexo 8. Cuadro de valores de temperaturas de melting de las muestras utilizada para estandarización de TNF-α

Well	Sample Type	Sample Name	Melt Temp 1
A01-Ch5	Reference Gene	A1	73.3
A02-Ch5	Reference Gene	A2	72.55
A03-Ch5	Reference Gene	A3	72.35
A04-Ch5	Reference Gene	A4	73.0699999999998
A05-Ch5	Reference Gene	A5	74.3
B01-Ch5	Reference Gene	B1	72.6
B02-Ch5	Reference Gene	B2	72.8799999999999
B03-Ch5	Reference Gene	B3	72.8299999999999
B04-Ch5	Reference Gene	B4	72.6199999999999
B05-Ch5	Reference Gene	B5	78.9100000000001
C01-Ch5	Reference Gene	C1	72.82
C02-Ch5	Reference Gene	C2	72.56
C03-Ch5	Reference Gene	C3	72.5099999999999
C04-Ch5	Reference Gene	C4	72.5099999999999
C05-Ch5	Reference Gene	C5	72.72

Anexo 9. Curva de temperatura de melt para de TNF-α de las 15 diluciones evaluadas.



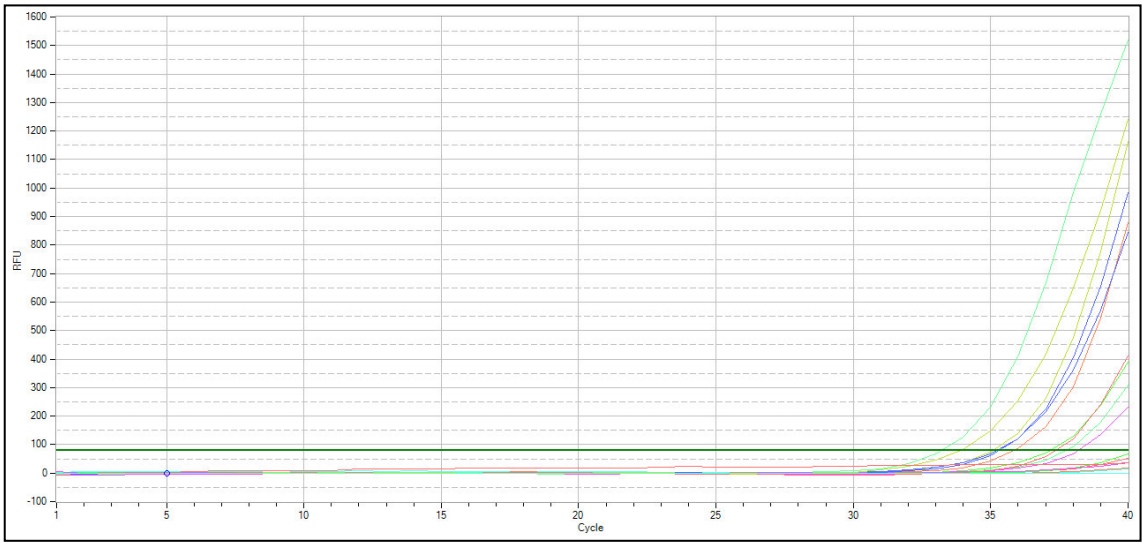
Anexo 10. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para TNF-α.



Anexo 11. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IL-10

Well	Sample Type	Sample Name	Cq
A01-Ch5	Reference Gene	A1	NeuN
A02-Ch5	Reference Gene	A2	35.87
A03-Ch5	Reference Gene	A3	35.13
A04-Ch5	Reference Gene	A4	37.17
A05-Ch5	Reference Gene	A5	33.25
B01-Ch5	Reference Gene	B1	NeuN
B02-Ch5	Reference Gene	B2	37.76
B03-Ch5	Reference Gene	B3	NeuN
B04-Ch5	Reference Gene	B4	35.26
B05-Ch5	Reference Gene	B5	NeuN
C01-Ch5	Reference Gene	C1	35.31
C02-Ch5	Reference Gene	C2	38.2
C03-Ch5	Reference Gene	C3	37.35
C04-Ch5	Reference Gene	C4	NeuN
C05-Ch5	Reference Gene	C5	33.97
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	NeuN

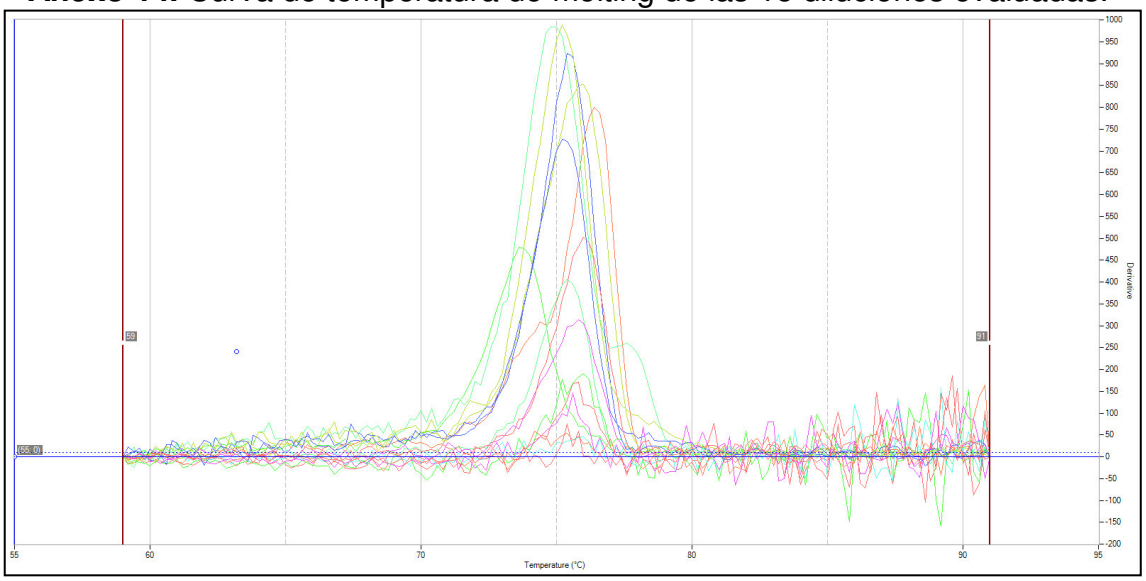
Anexo 12. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-10.



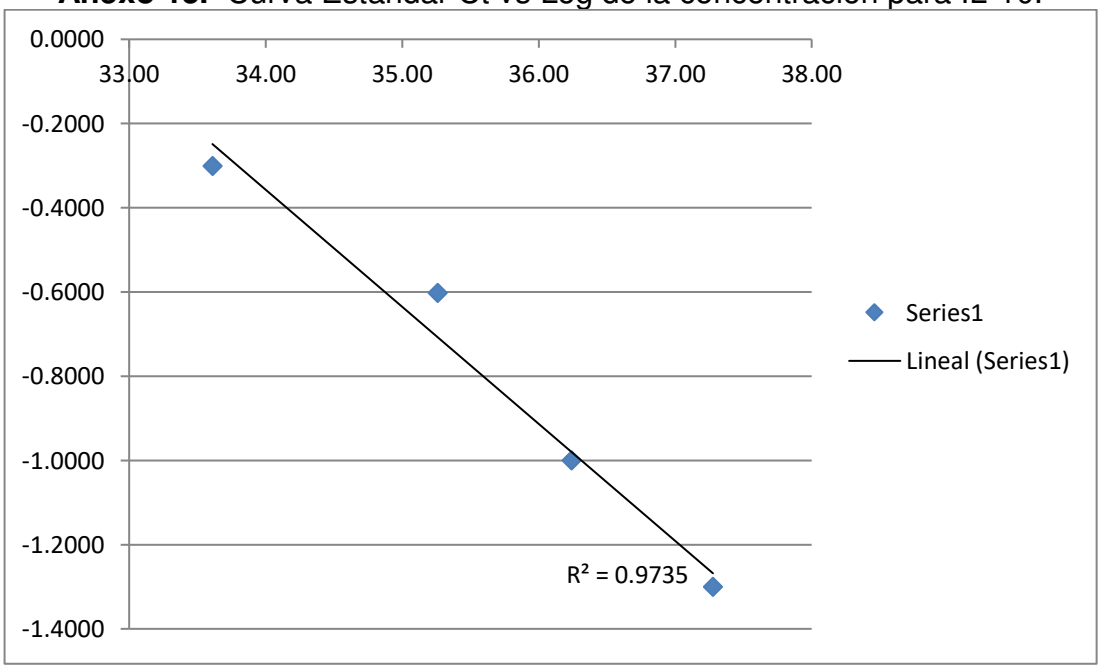
Anexo 13. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IL-10

Well	Sample Type	Sample Name	Melt Temp 1
A01-Ch5	Reference Gene	A1	75.75
A02-Ch5	Reference Gene	A2	76.31
A03-Ch5	Reference Gene	A3	75.6999999999998
A04-Ch5	Reference Gene	A4	73.66
A05-Ch5	Reference Gene	A5	74.87
B01-Ch5	Reference Gene	B1	75.7299999999999
B02-Ch5	Reference Gene	B2	75.34
B03-Ch5	Reference Gene	B3	89.2
B04-Ch5	Reference Gene	B4	75.21
B05-Ch5	Reference Gene	B5	75.4999999999999
C01-Ch5	Reference Gene	C1	75.42
C02-Ch5	Reference Gene	C2	75.6399999999999
C03-Ch5	Reference Gene	C3	75.93
C04-Ch5	Reference Gene	C4	90.6999999999999
C05-Ch5	Reference Gene	C5	75.16
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	89.4499999999999

Anexo 14. Curva de temperatura de melting de las 15 diluciones evaluadas.



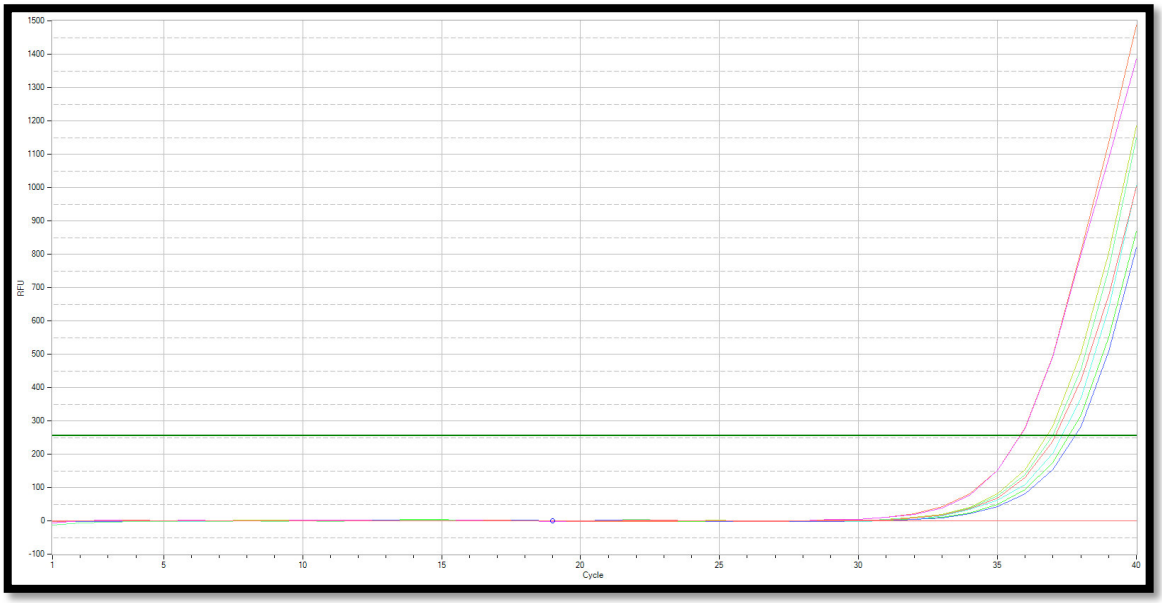
Anexo 15. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IL-10.



Anexo 16. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IL-4

Well	Sample Type	Sample Name	Cq
A01-Ch5	Reference Gene	A1	34.33
A02-Ch5	Reference Gene	A2	36.22
A03-Ch5	Reference Gene	A3	36.77
A04-Ch5	Reference Gene	A4	37.06
A05-Ch5	Reference Gene	A5	39.85
B01-Ch5	Reference Gene	B1	34.42
B02-Ch5	Reference Gene	B2	NeuN
B03-Ch5	Reference Gene	B3	36.06
B04-Ch5	Reference Gene	B4	36.46
B05-Ch5	Reference Gene	B5	NeuN
C01-Ch5	Reference Gene	C1	34.62
C02-Ch5	Reference Gene	C2	36.62
C03-Ch5	Reference Gene	C3	35.78
C04-Ch5	Reference Gene	C4	NeuN
C05-Ch5	Reference Gene	C5	38.06
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	34.33

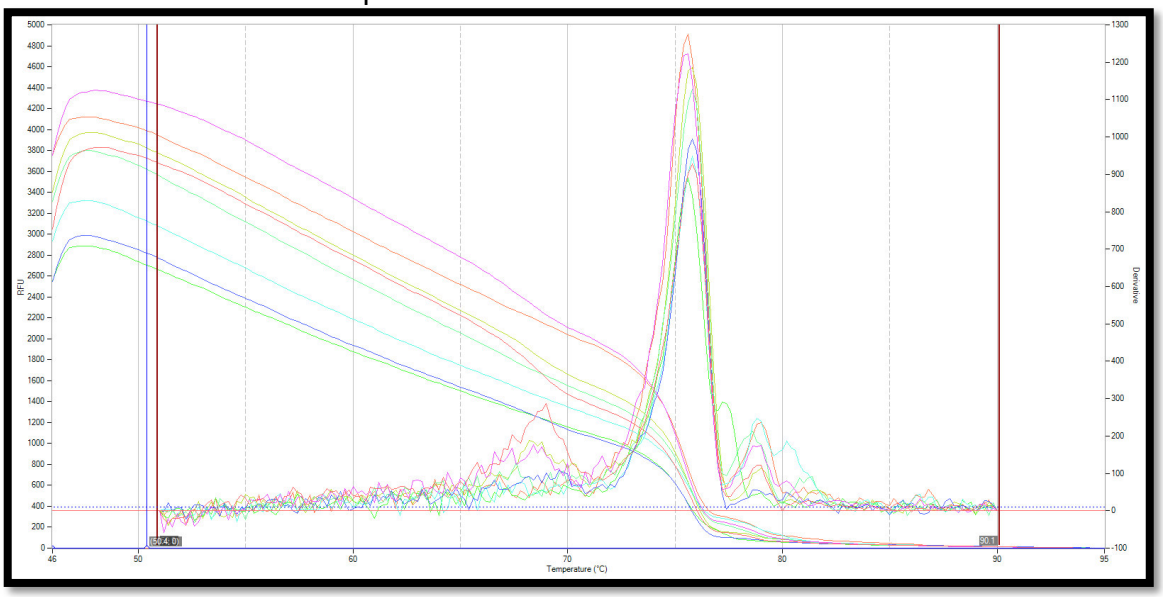
Anexo 17. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-4.



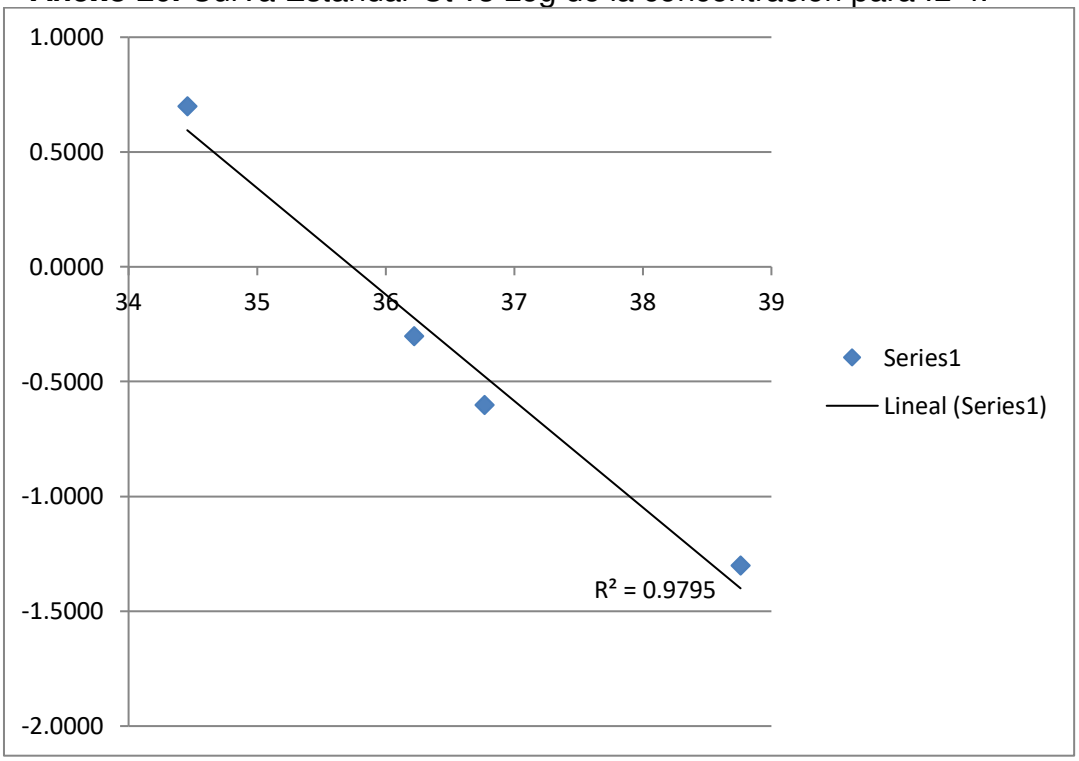
Anexo 18. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IL-4

Well	Sample Type	Sample Name	Melt Temp 1
A01-Ch5	Reference Gene	A1	76.19
A02-Ch5	Reference Gene	A2	75.4899999999999
A03-Ch5	Reference Gene	A3	75.6799999999999
A04-Ch5	Reference Gene	A4	75.55
A05-Ch5	Reference Gene	A5	75.86
B01-Ch5	Reference Gene	B1	76.0699999999999
B02-Ch5	Reference Gene	B2	75.6799999999999
B03-Ch5	Reference Gene	B3	75.6799999999999
B04-Ch5	Reference Gene	B4	75.72
B05-Ch5	Reference Gene	B5	84.02
C01-Ch5	Reference Gene	C1	75.677777777777
C02-Ch5	Reference Gene	C2	75.4199999999999
C03-Ch5	Reference Gene	C3	75.6599999999999
C04-Ch5	Reference Gene	C4	75.8799999999999
C05-Ch5	Reference Gene	C5	75.88
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	68.8999999999999

Anexo 19. Gráfico de temperaturas de melting de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-4.



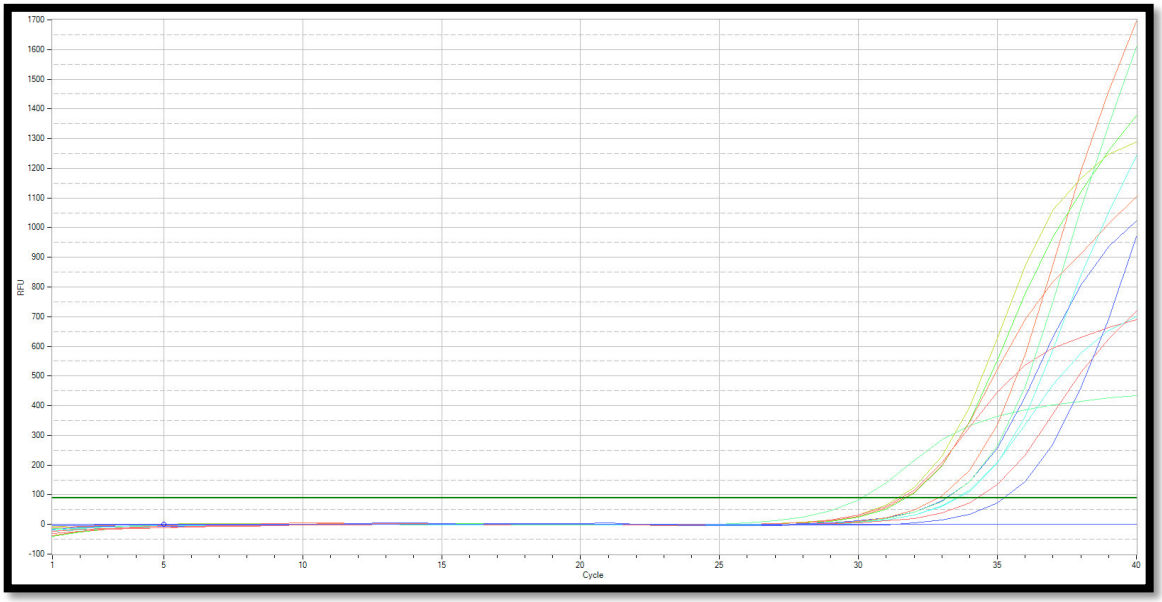
Anexo 20. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IL-4.



Anexo 21. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ.

Well	Sample Type	Sample Name	Cq
A01-Ch5	Reference Gene	A1	33.5
A02-Ch5	Reference Gene	A2	35.87
A03-Ch5	Reference Gene	A3	35.13
A04-Ch5	Reference Gene	A4	38.92
A05-Ch5	Reference Gene	A5	33.25
B01-Ch5	Reference Gene	B1	NeuN
B02-Ch5	Reference Gene	B2	33.52
B03-Ch5	Reference Gene	B3	NeuN
B04-Ch5	Reference Gene	B4	35.26
B05-Ch5	Reference Gene	B5	NeuN
C01-Ch5	Reference Gene	C1	35.31
C02-Ch5	Reference Gene	C2	38.2
C03-Ch5	Reference Gene	C3	37.35
C04-Ch5	Reference Gene	C4	37.84
C05-Ch5	Reference Gene	C5	38.41
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	NeuN

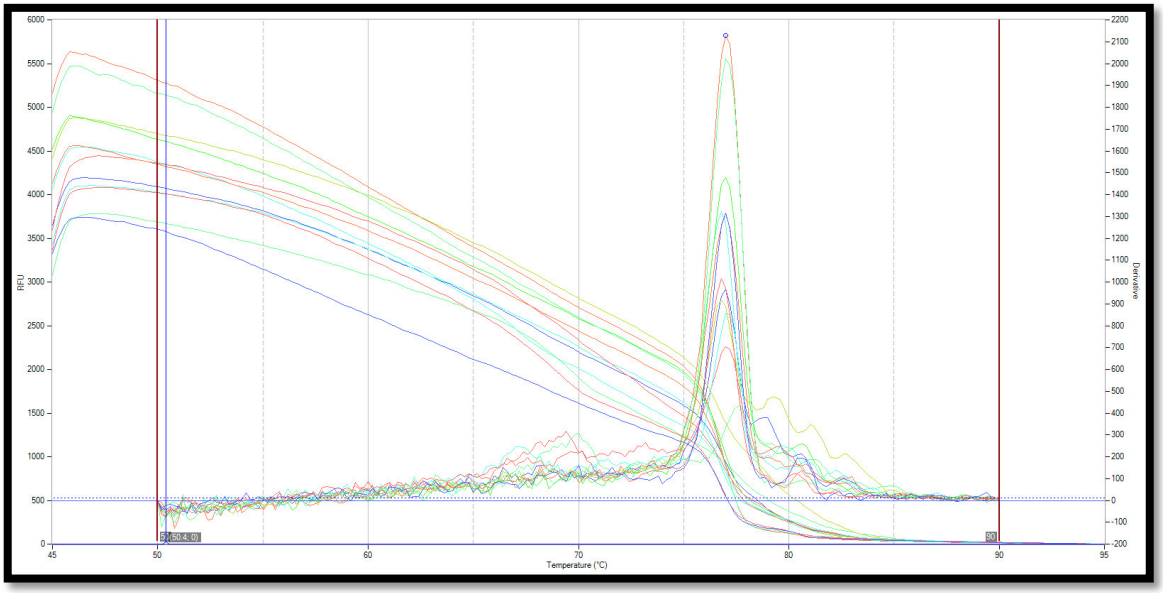
Anexo 22. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ.



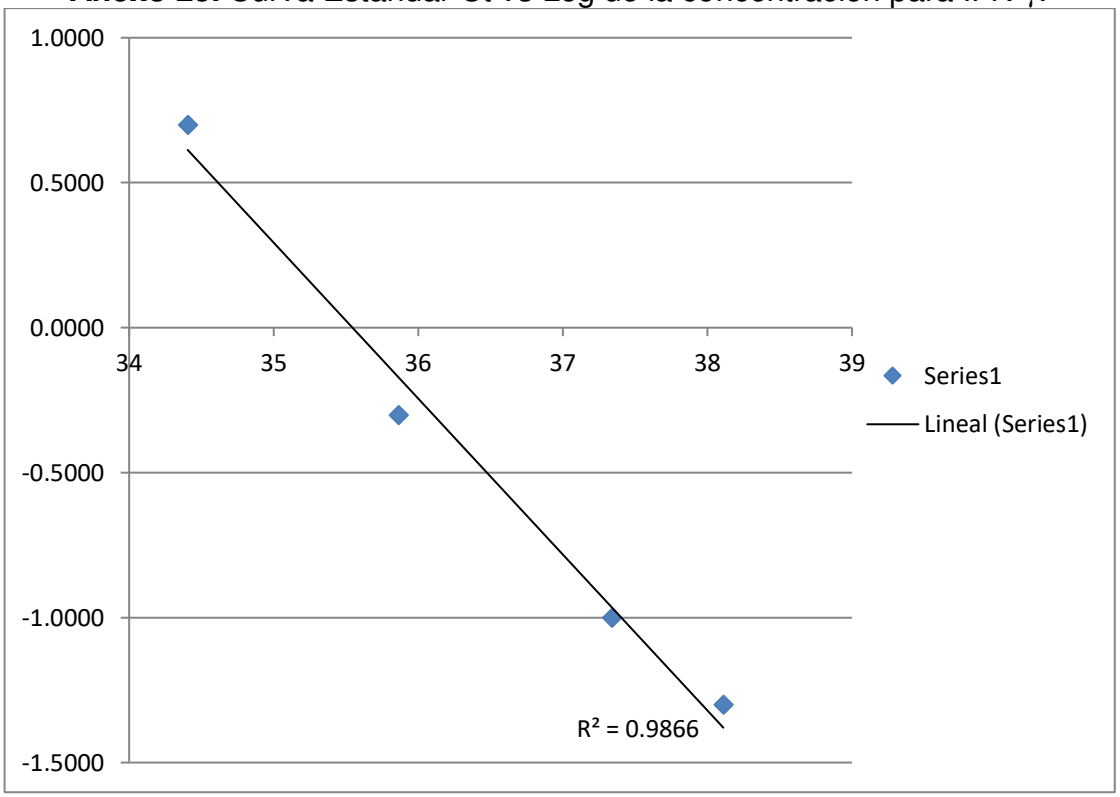
Anexo 23. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ.

Well	Sample Type	Sample Name	Melt Temp 1
A01-Ch5	Reference Gene	A1	77.44
A02-Ch5	Reference Gene	A2	77.36
A03-Ch5	Reference Gene	A3	77.73
A04-Ch5	Reference Gene	A4	76.74
A05-Ch5	Reference Gene	A5	76.95
B01-Ch5	Reference Gene	B1	86.0699999999999
B02-Ch5	Reference Gene	B2	76.83
B03-Ch5	Reference Gene	B3	75.6799999999999
B04-Ch5	Reference Gene	B4	76.88
B05-Ch5	Reference Gene	B5	84.02
C01-Ch5	Reference Gene	C1	76.82
C02-Ch5	Reference Gene	C2	77.02
C03-Ch5	Reference Gene	C3	77.06
C04-Ch5	Reference Gene	C4	77.03
C05-Ch5	Reference Gene	C5	77.26
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	76.82

Anexo 24. Gráfico de temperaturas de melting de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IFN-γ.



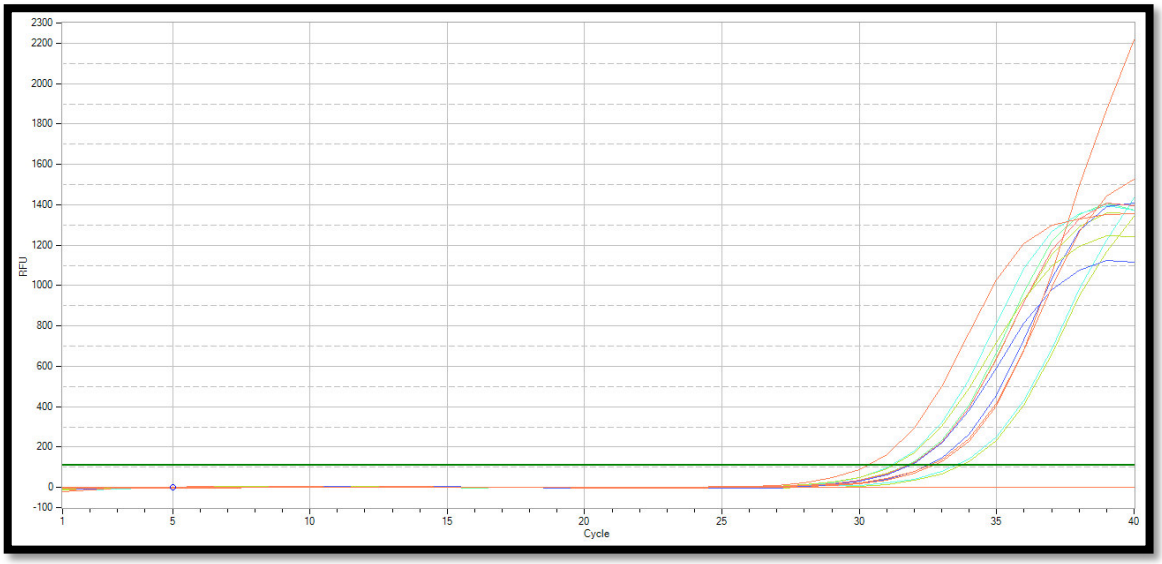
Anexo 25. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IFN-γ.



Anexo 26. Cuadro de valores Cq de las muestras utilizadas para estandarización de IL-2.

Well	Sample Type	Sample Name	Cq
A01-Ch5	Reference Gene	A1	33.89
A02-Ch5	Reference Gene	A2	NeuN
A03-Ch5	Reference Gene	A3	36.59
A04-Ch5	Reference Gene	A4	NeuN
A05-Ch5	Reference Gene	A5	37.81
B01-Ch5	Reference Gene	B1	33.33
B02-Ch5	Reference Gene	B2	34.42
B03-Ch5	Reference Gene	B3	NeuN
B04-Ch5	Reference Gene	B4	36.64
B05-Ch5	Reference Gene	B5	37.74
C01-Ch5	Reference Gene	C1	34.36
C02-Ch5	Reference Gene	C2	34.83
C03-Ch5	Reference Gene	C3	34.33
C04-Ch5	Reference Gene	C4	36.13
C05-Ch5	Reference Gene	C5	34.56
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	33.89

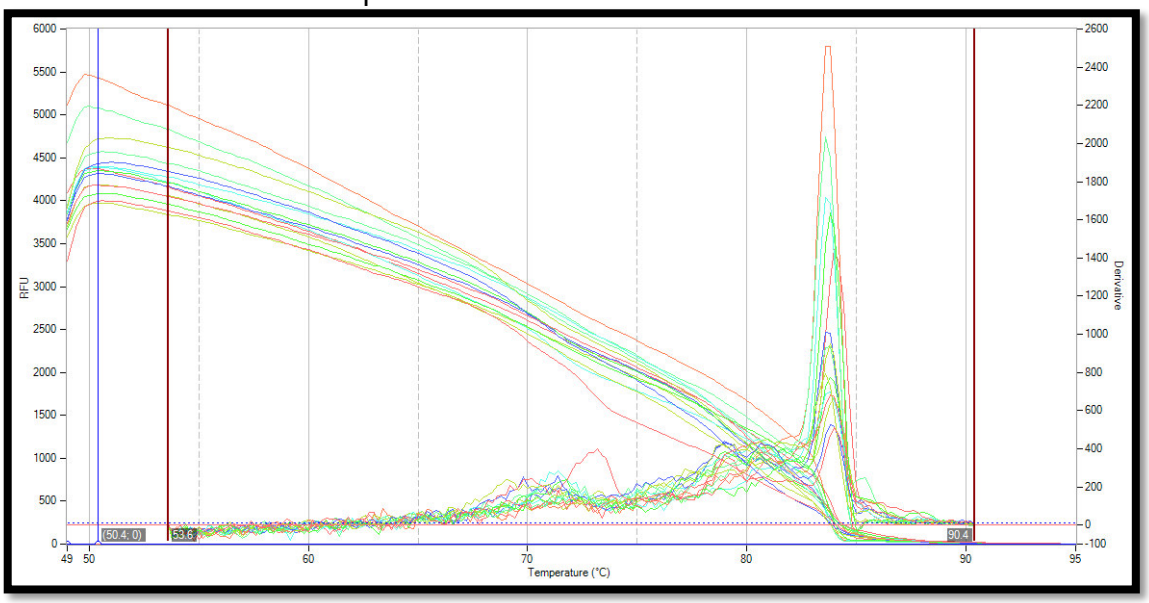
Anexo 27. Gráfico de valores Cq de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-2.



Anexo 28. Cuadro de valores de Temperaturas de melting de las muestras utilizadas para estandarización de IL-2

Well	Sample Type	Sample Name	Melt Temp 1
A01-Ch5	Reference Gene	A1	83.77
A02-Ch5	Reference Gene	A2	75.64
A03-Ch5	Reference Gene	A3	83.64
A04-Ch5	Reference Gene	A4	76.66
A05-Ch5	Reference Gene	A5	83.66
B01-Ch5	Reference Gene	B1	83.66
B02-Ch5	Reference Gene	B2	83.68
B03-Ch5	Reference Gene	B3	73.65
B04-Ch5	Reference Gene	B4	83.47
B05-Ch5	Reference Gene	B5	83.65
C01-Ch5	Reference Gene	C1	83.59
C02-Ch5	Reference Gene	C2	83.35
C03-Ch5	Reference Gene	C3	83.78
C04-Ch5	Reference Gene	C4	83.66
C05-Ch5	Reference Gene	C5	83.68
D01-Ch5	Negative Control	Blanco	73.44

Anexo 29. Gráfico de temperaturas de melting de las 15 muestras utilizadas para estandarización de IL-2.



Anexo 30. Curva Estándar Ct vs Log de la concentración para IL-2.

