



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Detección de citoquinas inductora y efectora para la
diferenciación y función de linfocitos colaboradores 17
(Th17) en mucosa intestinal de crías de alpaca
(Vicugna pacos)**

TESIS

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

AUTOR

Antonio HERRERA ROSALINO

Lima, Perú

2012

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar y comparar niveles relativos de ARN mensajero (ARNm) de citoquinas que estimulan y efectúan respuesta tipo Th17 en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y enfermas con enteropatías de uno hasta los 45 días de edad. Se muestrearon 66 animales: 35 sanos y 31 enfermos, se tomaron dos cm. de porción media del yeyuno. Una parte de las muestras fueron conservadas a -196°C ; y la otra fue embebida en formaldehído tamponado 10%. Se realizó extracción del ARN total de las muestras conservadas a -196°C ; y posteriormente se sintetizó ADN complementario (ADNc). Se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias de bovino (*Bos taurus*) para determinar expresión del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e interleuquina 17 (IL-17). Se realizó medición de expresión relativa del ARNm de ambas citoquinas mediante RT-PCR tiempo real. Los valores de expresión fueron normalizados con ARNm del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); y los cálculos de expresión relativa se realizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Se obtuvieron cortes histológicos de las muestras de animales enfermos para realizar el diagnóstico histológico con tinción Hematoxilina y Eosina (H:E). Los resultados mostraron que RT-PCR tiempo real mide específicamente la expresión del TGF- β e IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpaca a partir de un día de edad. Además, durante una enteritis aguda, la producción de ARNm de IL-17 es estimulada como otro mecanismo del sistema inmune contra microorganismos patógenos como bacterias y parásitos, alcanzando niveles de expresión de hasta 1295.05 ± 161.42 veces lo observado al primer día de edad, existiendo diferencia estadística entre crías de alpacas sanas y enfermas con enteropatía ($p < 0.05$). Se determinó que la enteritis necrótica difusa aguda asociada a bacterias presentaba los mayores niveles de expresión de IL-17. Por lo tanto, se concluye que existe respuesta tipo Th17 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas con enteropatía de uno a 45 días de edad.

Palabras clave: Interleuquina 17, factor de crecimiento transformante- β , RT-PCR tiempo real, ARN mensajero, mucosa intestinal, alpaca

ABSTRACT

The aim of this study was to determine and compare relative levels of RNA messenger (RNAm) of cytokines that stimulate and carry out a response of T helper lymphocytes type 17 (Th17) on intestinal mucosal of young health and sick with inflammatory bowel alpacas (*Vicugna pacos*) from one to 45 days of age. There were sampled 66 animals: 35 healths and 31 sick, it was taken two cm. from middle part of jejunum. One part of samples were conserved to -196°C and the another part was soaked in buffered formaldehyde 10%. It was made an extraction of Total RNA from intestinal mucosal; subsequently it was synthesize complementary DNA (cDNA). There were designed primers from bovine sequence (*Bos taurus*) to determinate the expression of transforming growth factor- β (TGF- β) and interleukin 17 (IL-17) on intestinal mucosal from young alpacas. It was made the measurement of relative expression of RNAm cytokines using real time RT-PCR. The levels of expression were normalized with RNAm Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, and the calculation of relative expression was made using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. There were obtained histological slices of jejunum from sick animals in order to know their histopathology diagnostic with Hematoxylin and Eosin (H:E) stain. The results showed that real time RT-PCR measure specifically the production of TGF- β and IL-17 on intestinal mucosal of young alpacas from one day of age, as in health and sick animals from one to 45 days of age. Moreover, during acute enteritis, the production of RNAm of IL-17 is stimulated as another mechanism of immune system against pathogen microorganisms such as bacteria and parasites, reaching levels of expression to 1295.05 ± 161.42 times to observe the first day of age, existing significant difference between young health and sick alpacas ($p < 0.05$). There was determined that acute diffuse necrotic enteritis associate to bacteria had major levels of IL-17 RNAm expression. In conclusion, there is a Th17 response in intestinal mucosa of young health and sick alpacas from one to 45 days of age.

Key words: Interleukin 17, transforming growth factor- β , real time RT-PCR, RNAm, intestinal mucosa, alpacas