





## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Alberto Manchego Sayán, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo, por darme la libertad y confianza de trabajar en armonía. Siempre disfruto las conversaciones académicas y las no tan académicas, hay siempre algo que aprender con usted.

A la Dra. Hermelinda Rivera Gerónimo, de la quien he aprendido mucho y continuaré haciéndolo. Mas allá de su gran sapiencia académica, está su grandeza humana, usted es la demostración de que podemos vivir en paz, tranquilos con uno mismo, haciendo siempre el bien a los demás. Usted es el ejemplo que se necesita en la universidad.

A la Dra. Nieves Sandoval Chaupe quien brindó su apoyo al estudio, persona de la quien recibo consejos para ser cada día mejor, es una persona importante en mi vida, no lo olvide, sus consejos siempre precisos llegan en el momento adecuado.

A mi amiga Mercy, ya madre ahora, haz logrado la plenitud como mujer, junto a Pedro y Pedrito, sé que sabrás manejar todo lo nuevo que se viene de la mejor forma, siempre con esa sonrisa en tu rostro, nunca la ocultes. A mi amiga Kim Lam, ahora en tierras lejanas, pero siempre en nuestros recuerdos, fuerza amiga, pronto nos veremos.

A mi amiga Mariluz, siguiendo una nueva vida, con la que di mis primeros pasos en el laboratorio ese verano del 2004, algún día nos veremos. A mi amigo Víctor Roca, ahora a la distancia, ese amigo con el que se puede confiar. Siempre seremos amigos.

A los amigos del laboratorio, tesisistas del hoy y del ayer, con los cuales tuvimos vivencias de todo tipo, esas vivencias sirvieron y servirán para ser mejor como profesional cada día. A Vicente Mercado por su ayuda constante en el laboratorio.

A los amigos de la promoción LXXI, la casa blanca, fueron seis años juntos, tuvimos vivencias que jamás olvidaremos y que marcaron nuestra vida para siempre.

A los amigos de las pichangas y de los laboratorios, por ser la forma de salir de la rutina sin excesos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y a la Unidad de Postgrado de la UNMSM por ser mi Alma Mater y brindarme los conocimientos para volverme un profesional. Trataré siempre de comportarme a la altura.

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FINCyT-PIBAP 2008) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCyTEC) por brindar el financiamiento para la elaboración del estudio.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>XV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Respuesta inmune:</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Citoquinas:</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Inmunidad humoral:</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Interleucina – 4 (IL-4):</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2. Interleucina – 10 (IL-10):</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Inmunidad celular:</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1. Interleucina – 2 (IL-2):</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2. Interferón gamma (IFN-<math>\gamma</math>):</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Inmunidad de mucosas:</b>	<b>25</b>
<b>2.6. Ácido retinoico:</b>	<b>27</b>

<b>2.7.</b>	<b>Enterotoxemia:</b>	<b>29</b>
	2.7.1. Definición:	29
	2.7.2. Etiología:	30
	2.7.3. Fisiopatogénesis de la enfermedad:	30
	2.7.4. Diagnóstico:	31
	2.7.5. Tratamiento:	31
	2.7.6. Control y prevención:	32
<b>2.8.</b>	<b>Vacunación:</b>	<b>32</b>
<b>2.9.</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa:</b>	<b>33</b>
	2.9.1. Pasos:	34
	2.9.1.1. Desnaturalización:	34
	2.9.1.2. Alineamiento o annealing:	34
	2.9.1.3. Extensión:	34
	2.9.2. Componentes:	35
	2.9.2.1. Muestra:	35
	2.9.2.2. Cebadores o iniciadores:	35
	2.9.2.3. Cloruro de Magnesio:	35
	2.9.2.4. Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs):	36
	2.9.2.5. Enzima:	36
<b>2.10.</b>	<b>Cuantificación relativa:</b>	<b>36</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>

<b>3.1. Preparación de antígenos clostridiales:</b>	<b>38</b>
<b>3.1.1. Cultivo bacteriano:</b>	<b>38</b>
<b>3.1.2. Purificación de proteínas:</b>	<b>38</b>
<b>3.1.3. Cuantificación de proteínas:</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Preparación de ácido retinoico:</b>	<b>39</b>
<b>3.3. Análisis <i>in vitro</i>:</b>	<b>39</b>
<b>3.4. Análisis <i>in vivo</i>:</b>	<b>40</b>
<b>3.4.1. Animales de experimentación:</b>	<b>40</b>
<b>3.4.2. Protocolo de administración:</b>	<b>40</b>
<b>3.5. Procesamiento de muestras:</b>	<b>41</b>
<b>3.6. Extracción de ARN mensajeros totales:</b>	<b>41</b>
<b>3.7. Síntesis de ADN complementario:</b>	<b>42</b>
<b>3.8. PCR en tiempo real:</b>	<b>43</b>
<b>3.9. Cuantificación relativa:</b>	<b>45</b>
<b>3.10. Análisis estadístico:</b>	<b>45</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Análisis <i>in vitro</i>:</b>	<b>46</b>
<b>4.1.1. Expresión de GAPDH:</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2. Expresión de TNF-<math>\alpha</math>:</b>	<b>46</b>
<b>4.1.3. Expresión de IFN-<math>\gamma</math>:</b>	<b>47</b>

4.1.4.	Expresión de IL-2:	48
4.1.5.	Expresión de IL – 10:	49
4.2.	Análisis <i>in vivo</i> :	50
4.2.1.	Expresión de GAPDH:	50
4.2.2.	Expresión de IFN – $\gamma$ :	51
4.2.3.	Expresión de TNF- $\alpha$ :	52
4.2.4.	Expresión de IL-2:	54
4.2.5.	Expresión de IL-4:	56
4.2.6.	Expresión de IL-10:	58
V.	DISCUSIÓN	61
VI.	CONCLUSIONES	70
VII.	LITERTURA CITADA	71
VIII.	APÉNDICE	81



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Control transcripcional de la polarización de la respuesta inmune Th1/Th2.....	24
Figura 2. Niveles de expresión de TNF- $\alpha$ en leucocitos tratados con la combinación de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). ....	47
Figura 3. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$ en leucocitos tratados con diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). CC = control celular (calibrador), ag = antígeno clostridial, ATRA= Ácido retinoico all-trans.....	48
Figura 4. Niveles de expresión de IL-2 en leucocitos tratados con diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). CC = control celular (calibrador), ag = antígeno clostridial, ATRA= Ácido retinoico all-trans.....	49
Figura 5. Niveles de expresión de IL-10 en leucocitos tratados con diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). CC = control celular (calibrador), ag = antígeno clostridial, ATRA= Ácido retinoico all-trans.....	50
Figura 6. Expresión relativa de IFN- $\gamma$ entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.....	51
Figura 7. Expresión relativa de IFN- $\gamma$ entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo. ...	52
Figura 8. Expresión relativa de TNF- $\alpha$ entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.....	53
Figura 9. Expresión relativa de TNF- $\alpha$ entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.....	54

Figura 10. Expresión relativa de IL-2 entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.....	55
Figura 11. Expresión relativa de IL-2 entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.....	56
Figura 12. Expresión relativa de IL-4 entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.....	57
Figura 13. Expresión relativa de IL-4 entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.....	61
Figura 14. Expresión relativa de IL-10 entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.....	62
Figura 15. Expresión relativa de IL-10 entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo ....	63
Figura A1: Curva de amplificación de los productos de ARN mensajeros del gen GAPDH, obtenidos de los leucocitos tratados.....	82
Figura A2: Temperatura de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen GAPDH, obtenidos de los leucocitos tratados.....	82
Figura A3: Curva de amplificación de de los productos de ARN mensajeros de TNF- $\alpha$ , obtenidos de los leucocitos tratados.....	83
Figura A4: Temperatura de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen TNF- $\alpha$ , obtenidos de los leucocitos tratados.....	83
Figura A5: Curvas de amplificación de los productos de ARN mensajeros de IFN- $\gamma$ , obtenidos de los leucocitos tratados.....	84

Figura A6: Temperatura de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen IFN- $\gamma$ , obtenidos de los leucocitos tratados.....	84
Figura A7: Curvas de amplificación de los productos de ARN mensajeros de IL-2, obtenidos de los leucocitos tratados.....	85
Figura A8: Temperaturas de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen IL-2, obtenidos de los leucocitos tratados.....	85
Figura A9: Curvas de amplificación de los productos de ARN mensajeros de IL-10, obtenidos de los leucocitos tratados.....	86
Figura A10: Temperaturas de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen IL-10; obtenidos de los leucocitos tratados.....	86
Figura A11: Curva de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para el gen GAPDH en las muestras de los individuos tratados y no tratados.....	87
Figura A12: Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para el gen GAPDH en las muestras de los individuos tratados y no tratados.....	87
Figura A13: Curva de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IFN- $\gamma$ .....	88
Figura A14: Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para determinación de la expresión de IFN- $\gamma$ .....	88
Figura A15: Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de TNF- $\alpha$ .....	89
Figura A16: Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para la determinación de la expresión de TNF- $\alpha$ .....	89
Figura A17: Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IL-2.....	90

Figura A18: Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para la determinación de la expresión de IL-2.....	90
Figura A19: Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para el gen IL-4.....	91
Figura A20: Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para el gen IL-4.....	91
Figura A21: Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para el gen IL-10.....	92
Figura A22: Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para el gen IL-10.....	92

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro A1: Niveles de expresión de las citoquinas de los individuos que no recibieron tratamiento, análisis en base al método de cuantificación relativa.....93

Cuadro A2: Niveles de expresión de las citoquinas de los individuos que recibieron tratamiento, análisis en base al método de cuantificación relativa.....94

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo A1. Análisis estadístico para la expresión de IFN-gamma.....	95
Anexo A2. Análisis estadístico para la expresión de TNF- $\alpha$ .....	97
Anexo A3. Análisis estadístico para expresión de IL-2.....	99
Anexo A4. Análisis estadístico para la expresión de IL-4.....	101
Anexo A5. Análisis estadístico para la expresión de IL-10.....	103

## RESUMEN

Se determinó los niveles de expresión de las principales citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular, realizando un análisis *in vitro*, que consistió en la inoculación de la ácido retinoico y antígenos de *Clostridium perfringens*, sobre leucocitos de alpaca; y un análisis *in vivo*, a través de la administración de la combinación a crías de alpacas. En el análisis *in vitro*, se realizaron evaluaciones a diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico. Para el estudio *in vivo* se administró el inóculo a una concentración de 0.25mg/Kg de antígeno clostridial (AgCP) y 0.067mM/Kg de ácido retinoico (ATRA) a doble dosis, a alpacas agrupadas en grupo 1, individuos de 1 día; y grupo 2, individuos de 7-14 días, considerando además animales que no recibieron el tratamiento. Los leucocitos inoculados y muestras de intestino de los individuos tratados y sus controles no tratados fueron procesados y analizados mediante cuantificación relativa por RT-PCR tiempo real. En las pruebas *in vitro*, se encontró un incremento creciente de la expresión de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina 2 (IL-2) hasta la concentración de 100pg AgCP y 25mUI ATRA. No encontrándose expresión a 10pg AgCP y 250mUI ATRA. Para factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) la expresión fue creciente hasta 10 pg de AgCP y 250mUI ATRA. Para la expresión de interleucina 10 (IL-10), ésta fue máxima a la concentración de 10ng de AgCP y 2.5 mUI de ATRA. El análisis *in vivo*, mostró una mayor expresión de IFN-gamma ( $p < 0.013$ ), IL-2 ( $p < 0.027$ ) y TNF-alfa ( $p < 0.007$ ), diferencia soportada por los individuos del grupo 2. Además, no se observó diferencia significativa para IL-4 e IL-10. Los resultados muestran efectividad en la estimulación de la respuesta inmune celular más no humoral. Se espera mejorar la respuesta inmune humoral, y así el tratamiento puede convertirse en un futuro cercano, en una alternativa para el control de la enterotoxemia en alpacas.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, ácido retinoico, inmunidad celular, inmunidad humoral, alpaca

## ABSTRACT

It was determined the levels of expression in the main cytokines of humoral and cellular immune response, it was done through *in vitro* analysis, consisting in inoculation of retinoic acid and *Clostridium perfringens* antigens, on leukocytes of alpaca; and *in vivo* analysis, through administration of combination to young alpacas. The analysis *in vitro* was done by evaluation at different concentrations of clostridium antigens and retinoic acid. In *in vivo* analysis, it was administered 0.25mg/Kg of clostridial antigens (AgCP) and 0.067mM/Kg of retinoic acid (ATRA) in double dose to grouped alpacas in 1 day animals (group 1) and 7-14 days animals (group 2). The inoculated leukocytes and intestine samples of treated animals were processed and analyzed through relative quantification by real time RT-PCR. *In vitro* assays reveal an increased growing of gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) and interleukin 2 (IL-2) expressions to 100pg AgCP and 25mUI ATRA concentration. It was not found expression at 10pg AgCP and 250mUI ATRA. For tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) the expression was growing to 10pg de AgCP and 250mUI ATRA. Whilst for interleukin 10 the expression was maximal at 10ng AgCP and 2.5mUI ATRA concentration. *In vivo* assays show an increased expression for IFN- $\gamma$  ( $p < 0.013$ ), IL-2 ( $p < 0.027$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.007$ ), and finding that this difference was supported by group 2 animals, in comparison with no treated animals. Furthermore, there was not difference for IL-4 and IL-10 with no treated animals. The results show effectiveness in cellular immune response stimulation but not for humoral response. We hope to improve the humoral immune response and convert this treatment in a way to control the enterotoxaemia in young alpacas.

keywords: *Clostridium perfringens*, retinoic acid, cellular immunity, humoral immunity, alpaca



## I. INTRODUCCIÓN

La enterotoxemia es una enfermedad ocasionada por varios agentes patógenos; que genera altas tasas de morbilidad y mortalidad neonatal, y ocasiona grandes pérdidas a los productores alpaqueros del país. El control de la enterotoxemia se basa en la higiene, el manejo adecuado de los animales y, en escasas ocasiones, en el uso de la vacunación (Ameghino y DeMartini, 1991). En el mercado nacional, se dispone de una vacuna a base de anacultivos de uno de los principales agentes, *Clostridium perfringens*; la cual genera una adecuada respuesta inmune sistémica (Yaya *et al.*, 2005). El estudio de la respuesta inmune local en el intestino, es la principal línea de defensa frente a la colonización y proliferación bacteriana en el tracto intestinal, y que por lo tanto, debe ser la principal vía de respuesta contra un proceso patológico enterotoxémico (Brown, 1996). Se ha demostrado la eficacia de inmunomoduladores e inmunoestimulantes en animales y el efecto que se ejerce sobre la respuesta inmune cuando se administran en combinación con las proteínas antigénicas del *Clostridium perfringens*. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre el efecto que ejercen los agentes inmunomoduladores e inmunoestimulantes en el intestino de los camélidos sudamericanos. Con ese fin, el presente estudio evaluó el efecto sobre la respuesta inmune intestinal de la administración de antígenos clostridiales con ácido retinoico, como inmunomodulador, a fin de brindar una visión de una nueva estrategia de control de la enfermedad, utilizando la modulación del sistema inmune intestinal vía oral y desarrollar el diseño de vacunas vía mucosas en el intento de reducir infecciones del tracto intestinal como la enterotoxemia.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Respuesta Inmune:

Los mamíferos superiores interactúan constantemente con agentes microbianos que pueden afectar su desarrollo, causando enfermedad, ya sea directamente dañando el tejido, o indirectamente a través de la inducción de respuestas inflamatorias (Pamer, 2007). El sistema inmune es la responsable de limitar el acceso de estos microorganismos a los tejidos del huésped. La respuesta inmune comprende una serie de mecanismos sucesivos y dependientes uno de otro que se inician luego de la invasión del patógeno, y están clasificados en respuesta inmune innata y adquirida. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa frente a las infecciones mediado principalmente por mecanismos rápidos e inespecíficos. La respuesta inmune adquirida es la encargada de la eliminación de patógenos en la fase tardía de la infección, siendo por lo tanto un mecanismo altamente específico (Akira *et al.*, 2006).

Dentro de los medios de la inmunidad innata para la eliminación de patógenos se encuentran las barreras físicas, químicas y celulares. Entre las barreras físicas se encuentran la superficie epitelial, las secreciones; entre las barreras químicas tenemos a las enzimas como componentes principales y a los péptidos antimicrobianos; y las células dendríticas y macrófagos dentro de las barreras celulares (Janeway *et al.*, 2001). La respuesta inflamatoria es parte del mecanismo de respuesta inmune innato, ya que involucra eventos de vasodilatación, migración de leucocitos a la zona afectada y fagocitosis del agente (Burmester, 2003).

Luego de la respuesta inmune innata, el organismo debe desencadenar una respuesta específica. El sistema inmune adquirido o también denominado adaptativo posee recursos mas específicos como los linfocitos T y B, los cuales median la eliminación de patógenos a través del desencadenamiento de vías de respuesta celulares y/o humorales, originando además memoria inmunológica (Goldsby *et al.*, 2002; Burmester, 2003).

Los linfocitos Th1 (T auxiliares 1) y Th2 (T auxiliares 2) existen en las diferentes especies mamíferas. Todos los linfocitos Th provienen de una estirpe celular nativa como los linfocitos Th0, las cuales se pueden diferenciar en linfocitos activados Th1 o Th2. Estos tipos de linfocitos Th0 tienen un perfil de citoquinas intermedio entre los dos subgrupos de linfocitos Th1 y Th2, es decir, que estos pueden secretar tanto citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular. Evidencias al respecto, demuestra la existencia de un subgrupo adicional, denominado Th3, el cual está implicado en la secreción de TGF- $\beta$ , y está asociado con la regulación de la respuesta inmune de mucosas (Xin *et al.*, 2007).

Los linfocitos Th1 son los principales reguladores de la respuesta inmune celular. La principal citoquina implicada en este tipo de respuesta es el Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), ésta participa en la estimulación de la fagocitosis, del estallido oxidativo, y de la destrucción de los antígenos intracelulares. El IFN- $\gamma$  también participa en la sobreexpresión de las moléculas de MHC de tipo I y II, permitiendo así estimular la presentación antigénica a los linfocitos T (Akira *et al.*, 2006).

## **2.2. Citoquinas:**

Las citoquinas o quimiocinas son proteínas secretadas por ciertas poblaciones celulares que ejercen su efecto sobre otros blancos celulares, uniéndose a receptores específicos localizados en sus membranas celulares. Ésta unión permite el desencadenamiento de traducción de señales intracelulares, con la consiguiente activación de factores transcripcionales, los cuales permitirán la expresión de proteínas codificadas en el genoma celular (Janeway *et al.*, 2001). De este modo, las citoquinas actúan como hormonas inmunoregulatoras y/o efectoras, motivo por el cual, juegan un rol importante en la respuesta inmune (Goldsby *et al.*, 2002). Dentro de la respuesta

inmune humoral y celular, existen citoquinas que median el desencadenamiento de cada una de estas vías (Janeway *et al.*, 2001). Una gran cantidad de evidencias señalan diferencias en el patrón de citoquinas dependiendo de la respuesta de células T auxiliares y células T citotóxicas, lo cual está relacionado al tipo de noxa que desencadena el cuadro.

La adecuada respuesta inmune implica una interacción compleja entre las células linfoides, células inflamatorias y hematopoyéticas, esta interacción es llevada a cabo por un grupo de proteínas denominadas citoquinas, nombre que define la actividad que cumplen en la comunicación célula-célula. Las citoquinas se unen a receptores celulares que se encuentran en la superficie de sus células blanco, lo que desencadena la expresión genética (Leach *et al.*, 2003). Dependiendo de la localización y cercanía de los blancos celulares, éstas citoquinas tendrán efectos autocrino, cuando ejercen su efecto en la misma célula que lo secretó; paracrino, cuando su efecto se realiza en blancos cercanos; y endocrinas, cuando sus blancos se localizan en otras zonas lejanas al lugar de secreción. Las citoquinas son las principales reguladoras de la intensidad y duración de la respuesta inmune por activar o inhibir la activación, proliferación y diferenciación de varias poblaciones celulares y/o por regular la producción de anticuerpos u otras citoquinas (Goldsby *et al.*, 2002).

Las citoquinas exhiben diferentes atributos como pleiotropismo, mediante el cual pueden ejercer efecto en diferentes tipos celulares, ejerciendo diferentes efectos; redundancia; cuando dos o más citoquinas tienen las mismas funciones; sinergismo, cuando el efecto combinado de varias citoquinas es mayor que el efecto aditivo de cada uno de ellos; antagonismo, cuando los efectos de una citoquina reduce el efecto de otras. Muchas citoquinas son denominadas interleucinas, para referir el efecto ejercido en la comunicación de los leucocitos, se ha determinado las interleucinas del 1 al 25, sin embargo, está claro que faltan muchos por describir (Janeway *et al.*, 2001).

En la actualidad se han secuenciado casi la totalidad de los genes descubiertos, logrando determinar la estructura y función de cada una de éstas. Las citoquinas tienen peso molecular menos de 30KDa. Así, las citoquinas están agrupadas en 4 grupos: La familia

de las hematopoyetinas, la familia interferón, la familia de las quimiocinas y la familia del factor de necrosis tumoral (Goldsby *et al.*, 2002).

### **2.3. Inmunidad humoral:**

El organismo debe montar una respuesta adecuada frente al patógeno específico, por lo tanto, en una infección causada por antígenos extracelulares, la vía de respuesta adecuada es la respuesta inmune humoral, la cual es mediada por anticuerpos. Los anticuerpos son glicoproteínas de superficie de las células B, pero que son secretadas por los plasmocitos, células diferenciadas de los linfocitos B, luego que son estimulados frente al patógeno específico (Burmester 2003). Estos anticuerpos están dirigidos frente a moléculas altamente antigénicas que se encuentran presentes en la superficie de los patógenos o que forman parte de productos de secreción de los mismos, motivo por el cual frente a un estímulo antigénico en particular, se puede encontrar una población altamente heterogénea de anticuerpos, los cuales están dirigidos frente a todos los determinantes antigénicos o epítomos. La principal función de los anticuerpos es bloquear la actividad antigénica de estas moléculas, a través de su unión al antígeno, sin embargo, también participan en otras funciones efectoras como la interacción con otras glicoproteínas, células y tejidos que participan también en la respuesta inmune humoral (Janeway *et al.*, 2002).

Una de las principales actividades efectoras de los anticuerpos en la respuesta inmune humoral es actuar como opsonina. El proceso de opsonización, mecanismo primordial de los anticuerpos, se basa en la unión de anticuerpos sobre la superficie de los antígenos y que facilita la fagocitosis del mismo a través de receptores específicos de las inmunoglobulinas, localizados en la membrana celular de los fagocitos que se unen con un alto grado de avidéz y afinidad a los anticuerpos a través de su fragmento Fc (Goldsby *et al.*, 2002). Así, se inicia una serie de eventos intracelulares de vías de traducción de señales, resultando en la fagocitosis del complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente el patógeno se vuelve blanco de una serie de eventos destructivos para la degradación del agente.

Como es claro, la activación de una respuesta inmune humoral depende básicamente del montaje de una respuesta en base a linfocitos B, y ésta se produce a través de la activación por antígenos solubles, lo cual a su vez requiere la participación de linfocitos T colaboradores. Luego de la captación antigénica el antígeno es procesado y posteriormente expresado en la superficie celular, proceso denominado presentación antigénica. El antígeno implicado es así presentado a un tipo linfoide especializado, los linfocitos T colaboradores. Aquí se producen una serie de señales bioquímicas bidireccionales, es decir, que permite la estimulación tanto de los linfocitos T como de los linfocitos B (Yagi *et al.*, 2002).

La respuesta inmune humoral es mediada principalmente por anticuerpos; este tipo de respuesta, también conocida como una respuesta Th2 (denominada así por el tipo de linfocitos T que la dirigen), son dirigidas por las Interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9) e interleucina 10 (IL-10) (Spellberg y Edwards, 2001). Estas células Th2 permiten la estimulación de altos títulos de anticuerpos, así las IL-4, 5 y 10, activan la proliferación de linfocitos B, producción de anticuerpos y el cambio de clases de los linfocitos B para expresar otro tipo de inmunoglobulina (“*switching*” en inglés). En efecto, el “*switching*” de clases de IgG a IgE no puede ocurrir sin la presencia de IL-4 o IL13. La IL-5 es una potente citoquina hematopoyética que estimula la producción de eosinófilos por la médula ósea, así como la activación y quimiotaxis de eosinófilos y basófilos. IL-4 e IL-10 inhiben la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , bloqueando así la posibilidad de que los linfocitos Th0 puedan polarizarse para el desarrollo de linfocitos Th1. Además, IL-4, IL-10 e IL-13 suprimen la fagocitosis, el estallido oxidativo, la destrucción intracelular e inhibe la presentación de antígenos (Leach *et al.*, 1999).

Existen factores que median la polarización de la respuesta Th1 y Th2, como son la producción de citoquinas locales, la presencia de sustancias inmunológicamente activas, la dosis y ruta de administración del antígeno, el tipo y forma de presentación del antígeno, y la “fuerza de la señal” que está relacionado al grado de avidez y afinidad entre el receptor de células T y las moléculas de MHC involucradas. De estos factores la presencia de citoquinas en la zona es la más importante. Así, se considera que la

principal citoquina que media la polarización Th2 es la interleucina 4 (Yagi *et al.*, 2002).

### **2.3.1. Interleucina 4 (IL-4):**

La interleucina 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. Se ha demostrado que IL-4 participa en el “*switching*” de clases de IgE e IgG1; y considerándose importante en el desarrollo de linfocitos Th2. 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 éstos 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). También se ha demostrado que IL-4 ejercer un efecto directo sobre el epitelio intestinal, reduciendo la respuesta secretoria de iones, reduciendo la resistencia eléctrica e incrementando la permeabilidad a moléculas de bajo peso molecular (Berin *et al.*, 1999).

### **2.3.2. Interleucina 10 (IL-10):**

La interleucina 10 es una citoquina antiinflamatoria considerada como citoquina Th2 que reduce la respuesta alérgica y la respuesta Th1 (Matheu y Barrios, 2004). Si bien es una citoquina antiinflamatoria, aún se desconoce el mecanismo de función exacto. Se ha demostrado que IL-10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos (CSF-GM). Además, IL-10 inhibe la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras sobre las células presentadoras de antígenos e incrementa la producción de mediadores antiinflamatorios. La IL-10 puede inhibir directamente las respuestas tipo Th1, por la reducción de producción de citoquinas proinflamatorias, o a través de la inhibición de linfocitos T (Leach *et al.*, 1999).

## **2.4. Inmunidad celular:**

El principal rol de la inmunidad mediada por células es detectar y eliminar las células infectadas con patógenos intracelulares. Además, la inmunidad mediada por células puede también eliminar células tumorales, debido a que pueden reconocer las modificaciones que se producen en sus superficies celulares (Goldsby *et al.*, 2002). Las células específicas que median este tipo de respuesta son los linfocitos T CD8, también llamados linfocitos T citotóxicos.

La activación de las células Th1, a través de las células presentadoras de antígenos, resulta en la secreción de citoquinas que activan macrófagos y coordinan la respuesta inmune mediada por células, así se permite la secreción de interleucina 2 (IL-2), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL- 12 (Janeway *et al.*, 2001).

### **2.4.1. Interleucina 2 (IL-2):**

La interleucina 2 (IL-2) es una citoquina regulatoria importante producida por un subgrupo de linfocitos T CD4, que amplifica el estímulo inmune para promover el crecimiento y expansión de los linfocitos T, contribuyendo a la diferenciación de linfocitos B y la activación de macrófagos, las células asesinas linfocito-activado (LAK) y las células asesinas naturales (NK) (Schultz *et al.*, 1999). La proliferación y crecimiento linfocítico es un proceso altamente regulado, los receptores de células T median la transición de ciclo celular G0/G1; y estimula a las células T a expresar IL-2 y su receptor (Gorjao *et al.*, 2007). En las superficies mucosas, la IL-2 estimula la proliferación de linfocitos, células NK y macrófagos. Además, se ha demostrado la presencia de receptores específicos de IL-2 en la superficie de diferentes estirpes celulares epiteliales, lo cual demuestra su rol fisiológico en la función epitelial (Morris y Waldmman 2000, Loughlin *et al.*, 2001).

### **2.4.2. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ):**

Los interferones son moléculas descubiertas por su acción antiviral, han sido clasificados en grupo I y II, de acuerdo a su secuencia aminoacídica, la afinidad a su



receptor y su localización en el genoma celular. El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es el único miembro perteneciente al grupo de II de la familia de los interferones, que desencadenan una respuesta inmune mediada por células. El IFN- $\gamma$  aumenta la defensa contra patógenos bacteriales y virales, y es producido por las células NK, células T CD4+ y T CD8+ (Carter y Murphy, 1999), se ha demostrado que la producción de IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  en las fases tardías de la respuesta inmune (Schroder *et al.*, 2004)

El IFN- $\gamma$  induce la transcripción génica a través de la activación de la vía Janus Kinasa (Jak) - traductor de señal y activador transcripcional 1 (STAT-1), mas 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- $\gamma$  está involucrado además en la expresión no solo de IL-12, sino además, de su receptor celular IL12R (Wakil *et al.*, 1998).

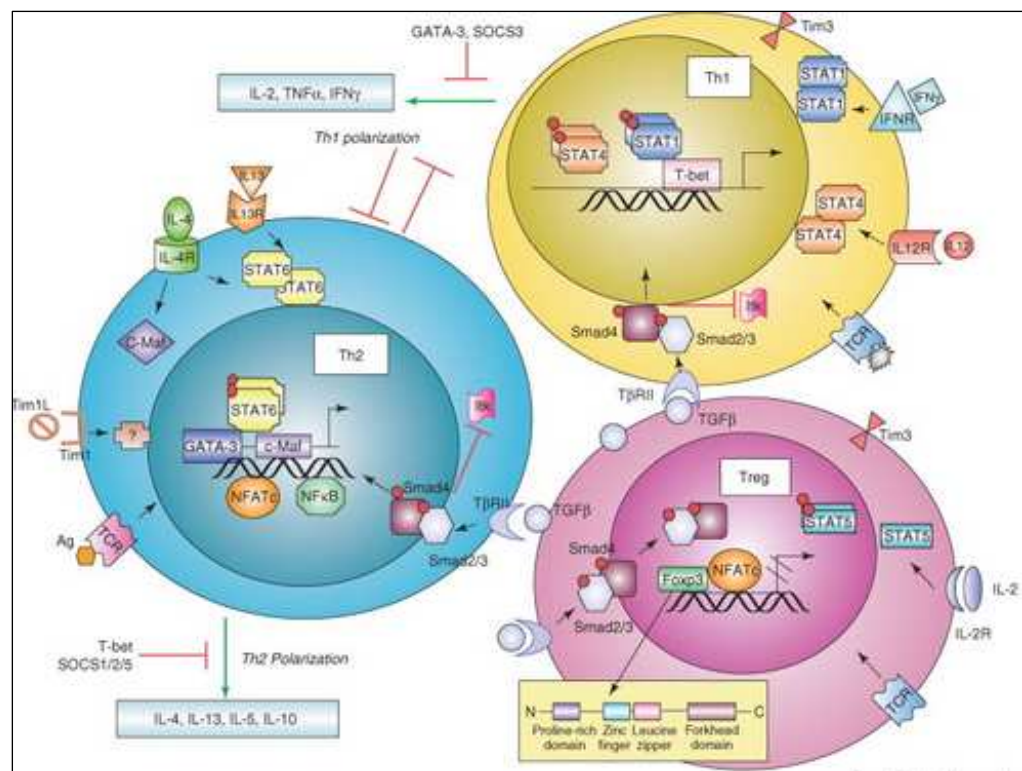


Fig. 1. Control transcripcional de la polarización de la respuesta inmune Th1/Th2 (Wahl *et al.*, 2004). Regulatory T cells and transcriptions factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*. 16(6): 768-774).

## 2.5. Inmunidad de Mucosas:

Los organismos superiores están expuestos constantemente a microorganismos del medioambiente en el cual se desarrollan, por lo tanto, están en una constante amenaza; así el sistema inmune es el medio para hacer frente a las infecciones por microorganismos (Mayer, 2003). La principal puerta de entrada para los microorganismos son las superficies corporales como la piel y las superficies mucosas (Shanahan, 2000). En ese sentido, el tracto intestinal se conforma como una de las principales puerta de entrada para los microorganismos potencialmente patógenos. Por lo tanto, se ha desarrollado un complejo sistema de defensa de mucosas intestinal. Sin embargo, es necesario que esta respuesta no sea exagerada, estableciéndose un grado de tolerancia inmunológica importante hacia microorganismos residentes normales, como la flora normal en el tracto intestinal (Liu y Lefrançois, 2004; Kaiserlian *et al.*, 2005; Pabst *et al.*, 2007). Al igual que en el sistema inmune sistémico, el sistema inmune de mucosas comprende al sistema inmune innato, el cual comprende las secreciones biliares, enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos, etc., de esta forma, gran cantidad de patógenos son neutralizados y eliminados a través de las heces.

El sistema inmune innato es la primera barrera de defensa que tienen que atravesar los microorganismos invasores cuando penetran el organismo (Kamysz *et al.*, 2003). En contraste a la inmunidad adquirida, el sistema inmune innato, posee una relativa no específica, pero inmediata protección contra patógenos invasores que no genera memoria inmunológica (Phadke *et al.*, 2005). El tracto intestinal posee diversas armas fisicoquímicas de protección innata para la invasión microbiana, que incluyen los movimientos peristálticos, la secreción de mucus, sales biliares, enzimas digestivas y proteínas secretadas; y armas celulares, como las células epiteliales, dendríticas, polimorfonucleares, etc. (Oppenheim *et al.*, 2003).

El mucus en la superficie apical y compuesta de productos secretados por el epitelio, juega un rol esencial en la protección de la mucosa intestinal (Podolski, 1999), unidas a las secreciones biliares y pancreáticas son parte del complejo fisicoquímico de defensa intestinal (Yuan y Walker, 2004), ya que los potenciales patógenos son atrapados en el mucus y son eliminados por los movimientos peristálticos del intestino (Mayer, 2003).

Las uniones estrechas son un mecanismo importante en la defensa de la capa epitelial intestinal, ya que previenen el pasaje de antígenos a la capa subyacente (Podolski, 1999; Mayer, 2003). Dentro de los componentes estructurales de las uniones estrechas se encuentran: Ocludinas, Cingulinas, Zónula Ocludens y otras proteínas; sin embargo, el conocimiento de los factores reguladores de las uniones estrechas es incompleto y se requieren mayores estudios (Podolski, 1999).

La superficie epitelial representa una barrera física importante en las superficies mucosas, formando no solo parte de la respuesta inmune inespecífica sino también parte de la respuesta inmune adaptativa. Las células epiteliales poseen moléculas receptoras en su superficie, éstas moléculas glicoproteicas conocidas como receptores de reconocimiento de patrón (PRR) tienen como función unirse a estructuras altamente antigénicas de los microorganismos patógenos e iniciar una respuesta frente a éstos (Liu y Lefrançois, 2004).

El tracto intestinal se encuentra repleto de folículos organizados y elementos linfoides sensibilizados y no sensibilizados como linfocitos B, T, células plasmáticas y otros tipos celulares junto con los anticuerpos, que están envueltos en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune de mucosas (Ogra *et al.*, 2001), los cuales se constituyen como mecanismos altamente específicos. La respuesta de anticuerpos en las superficies mucosas y en el tracto intestinal se basa en la expresión de inmunoglobulina A secretoria (sIgA) una estructura dimérica de la forma IgA producido por las células B activadas en la superficie epitelial, y que se encuentran unidas gracias al componente secretor que es parte del receptor polimérico localizado en las células epiteliales y que permite la transcitosis del polímero de IgA a través de las células epiteliales. Una vez en la superficie luminal, la sIgA se une a los potenciales antígenos, siendo eliminados por exclusión inmune (Favre *et al.*, 2005).

Un sin número de estudios han revelado que el principal rol de las citoquinas expresadas en el tracto intestinal para el montaje de la respuesta de células Th, es la expresión y secreción de sIgA. Así muchos protocolos de vacunaciones orales promueven la expresión de citoquinas de mucosas tipo Th1 y Th2, para la expresión de sIgA (Bokaya *et al.*, 1999). Los mecanismos de respuesta intestinal no se encuentran

completamente entendidos; sin embargo, se ha determinado que el perfil de citoquinas, sea Th1 o Th2, dependerá de la naturaleza del antígeno, de su procesamiento y presentación. Las citoquinas en la superficie mucosa intestinal juegan un rol primordial en la señalización bidireccional. La característica de la inflamación intestinal es la disrupción de la barrera epitelial. En relación a esto es importante mencionar que el balance entre las citoquinas proinflamatorias e inflamatorias es crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Perdue, 1999).

Luego de la presentación antigénica, las células Th nativas son diferenciadas hacia los dos tipos de células T colaboradoras, las Th1 eminentemente para la activación de macrófagos; y las Th2 para la respuesta humoral mediada por anticuerpos. Esta diferenciación está guiada por la activación de factores transcripcionales como STAT-6, GATA-3, c-maf, JunB involucrados en la activación Th2; y STAT-1 y STAT-4 involucrados en la expresión de citoquinas Th1 (Weigmann y Neurath, 2002). Se han determinado las citoquinas claves para la generación de diferentes subgrupos de células T, encontrando que IL-12 e IL-4 son claves para la inducción de respuesta de tipo 1 y tipo 2, respectivamente (Hoft y Eickhoff, 2005).

## **2.6. Ácido Retinoico:**

La vitamina A es esencial para una gran variedad de procesos biológicos, muchos de los cuales están relacionados con el crecimiento, diferenciación celular e interacciones célula-célula. En los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio de la relación de la vitamina A y la inmunidad en tres aspectos importantes: debido al efecto en la restauración epitelial en las superficies respiratorias y gastrointestinal; estimulación de ciertos tumores inmunogénicos; y actividad sobre la regulación genética a través de receptores nucleares (Catharine, 1992; Hoag *et al.*, 2002).

Los metabolitos activos de la vitamina A, como el ácido retinoico, tienen diversas actividades biológicas que incluyen rol en la visión, desarrollo embrionario, proliferación celular, diferenciación y muerte celular en una variedad de tipos celulares. El intestino absorbe y metaboliza la vitamina A en ácido retinoico, y en el tracto intestinal, es una importante señal reguladora en el medio ambiente intestinal (Xiao *et*

*al.*, 2008). El ácido retinoico existe en las dos formas isoméricas, cis y trans, encontrando que la forma trans es la metabólicamente más activa (Ott y Lachance, 1979).

Se ha demostrado en estudios *in vitro*, que muchas de las funciones de los macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales, linfocitos T y B, son modulados por la vitamina A y sus derivados. Además la producción y/o secreción de muchas citoquinas como el IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, 2, 3 y 4 y TGF- $\beta$  son regulados por la vitamina A y sus metabolitos, (como el ácido retinoico) e inclusive ejercen un efecto regulador en la expresión y actividad de muchas enzimas como fosfolipasa A2 y el óxido nítrico sintasa que participan en la reacción inflamatoria a patógenos (Devaux *et al.*, 2000)

El ácido retinoico all-trans (ATRA, del inglés all-trans retinoic acid) ha sido particularmente bien estudiado como un regulador de genes y una sustancia que normalmente puede regular a las células troncales hematopoyéticas, esto último debido al hallazgo que el ATRA promueve la retención de células troncales en cultivos celulares. Se ha demostrado que el ATRA promueve la progresión en la línea mieloide. Hay cientos de genes regulados por retinoides, dentro de los cuales podemos mencionar al *c-myc*, *stra-3*, *hoxb-4* y *notch 1*, todos relacionados a la linfopoyesis de células B en sus diferentes estadios (Chen *et al.*, 2008).

El ATRA es un regulador transcripcional de la expresión de genes. Así, los isómeros de ácido retinoico se unen a sus receptores nucleares de dos distintas clases: los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores X retinoides (RXR). Se ha sugerido que el ATRA se une a los receptores heterodiméricos RAR-RXR aumentando la transcripción de muchos genes codificando las moléculas coestimuladoras (Hoag *et al.*, 2002).

Se ha asociado la presencia de ácido retinoico con el tropismo celular de células T y B en su migración hacia el intestino delgado, concepto denominado “*homing*” linfoide (Kim, 2008). Además, se ha demostrado que el ácido retinoico ejerce un efecto supresor en la diferenciación de células T nativas en células Th17, al menos *in vitro* (Elías *et al.*, 2008).

Existen dos tipos de células T regulatorias (T reg), las T reg naturales, que son células generadas a nivel tímico; y las células T reg inducidas, las cuales son generadas a través de células T nativas en diferentes zonas del organismo, principalmente el tracto intestinal (Housley *et al.*, 2009). Así, se ha demostrado que el ácido retinoico en conjunción con TGF- $\beta$ , promueve la conversión de células T nativas en células T reg Foxp3+, permitiendo demostrar que las células T reg pueden ser producidas en la periferia bajo condiciones normales (Coombes *et al.*, 2007; Elías *et al.*, 2008). En conjunción con su función en inducir las células T regulatorias Foxp3+, el ácido retinoico es considerado una señal reguladora clave en inducir la tolerancia inmune intestinal (Wang *et al.*, 2010), a través de la estimulación en la expresión de TGF- $\beta$  (Maynard *et al.*, 2009). A su vez, también permite la estimulación de las células dendríticas para la generación de células T reg (Sun *et al.*, 2007)

Las células presentadoras de antígenos expresan moléculas coestimuladoras constitutivas e inducibles en su superficie celular, específicamente CD80, CD86, CD40 y OX40L, los cuales facilitan el desarrollo de las células Th2. Así la reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras ocurre en individuos deficientes de vitamina A, e incluso el ATRA actúa inversamente incrementando la expresión de las mismas (Hoag *et al.*, 2002).

Es importante evaluar los efectos del ácido retinoico, no solo en los estadios de deficiencia de vitamina A, sino también porque puede ser empleado en el manejo de vacunas. Estudios *in vitro* han demostrado el efecto del ácido retinoico, en su forma *all-trans*, en la función linfocitaria (Hoag *et al.*, 2002; Dzhagalov *et al.*, 2007).

## **2.7. Enterotoxemia:**

### **2.7.1. Definición:**

La enterotoxemia es una enfermedad que causa alta mortalidad (la cual puede llegar al 85%), en alpacas de los andes sudamericanos, afecta principalmente a crías de alpacas entre 2 a 7 semanas de edad. La enfermedad se presenta como brotes epizooticos cada 4 a 5 años. Es una toxemia generalizada originada a nivel intestinal debido a la

proliferación de diferentes agentes virales, parasitarios y bacterianos, dentro de los cuales el principal agente es el *Clostridium perfringens*, principalmente el tipo A; aunque se ha encontrado que los tipos B, C y D también pueden ser causantes de la enfermedad (Fowler, 1998; Prehn *et al.*, 1999). Inicialmente, la toxina  $\alpha$  fue considerada como el principal factor de virulencia involucrado en cuadros enterotoxémicos por *C. perfringens* tipo A, sin embargo, se ha demostrado la producción de la enterotoxina (CPE) aislados de casos de enterotoxemia (Ramírez, 1987). Estudios posteriores mencionan la probable poca participación de la enterotoxina (CPE) en los cuadros clínicos (Rosadio *et al.*, 2012).

### **2.7.2. Etiología:**

La enfermedad considerada como un complejo entérico es causado por la conjunción y proliferación de diferentes agentes como *E. coli*, coccidias, rotavirus, coronavirus y *C. perfringens* un bacilo gran positivo, aerobio facultativo, que mide entre 0.8 – 1.5 $\mu$ m de ancho por 4 – 8  $\mu$ m de largo. La longitud de la bacteria varía de acuerdo al estado de proliferación, así como la composición iónica y nutricional del medio. *C. perfringens* es un bacilo no móvil, capsulado y esporulado, (Pérez, 2006). El *Clostridium perfringens* ha sido dividido en cinco tipos (A, B, C, D y E) y cada uno de los tipos producen un patrón distinto de toxinas (McDonel, 1986). Se ha considerado que el tipo A es el principal causante de enterotoxemia (Ramírez, 1987; Rosadio *et al.*, 2008).

### **2.7.3. Fisiopatogénesis de la Enfermedad:**

La vía de ingreso de *C. perfringens* es oral. Actualmente se considera que existe una proliferación de otros patógenos bacterianos, virales y/o parasitarios. Probablemente las crías ingieren grandes cantidades de los patógenos en la ingesta de alimento. Posteriormente un cambio en el *pH* alcalino del tracto intestinal, el cambio de ingesta conjuntamente con un incremento de leche permitiría el desarrollo y multiplicación de *C. perfringens* y su esporulación; así se incrementa la producción de la toxina  $\alpha$  y la enterotoxina (CPE) (Ameghino y De Martini, 1991). Se ha hipotetizado que la CPE y la toxina alfa, en el lumen intestinal estarían involucrados en el incremento de la permeabilidad intestinal, con la consiguiente acumulación de fluidos en el tracto

intestinal y el pasaje de las toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez, 1987). Los animales afectados suelen morir por acidosis metabólica o shock toxémico, llegando a afectar al sistema nervioso central (Ameghino y De Martini, 1991). Estudios recientes demuestran la poca o nula participación de la CPE en infecciones por *Clostridium perfringens* en alpacas (Rosadio *et al.*, 2012).

#### **2.7.4. Diagnóstico:**

El diagnóstico se realiza principalmente de forma clínica y pocas veces se usan pruebas auxiliares para confirmar el diagnóstico de campo. Sin embargo, se ha reconocido que el diagnóstico de la enfermedad se debe realizar en base a las lesiones anatomopatológicas e histopatológicas (Pérez, 2006). El aislamiento bacteriano es uno de los principales medios de diagnóstico, el cultivo en anaerobiosis es una herramienta que permite la detección del agente. Existen además pruebas serológicas como ELISA para la detección de anticuerpos contra *C. perfringens* y pruebas con una menor especificidad como la inmunodifusión doble (Ramírez, 1987). La detección de las toxinas en individuos afectados es una herramienta que puede ser utilizada. Considerando que *C. perfringens* es parte de la flora normal intestinal, es importante la genotipificación bacteriana es necesaria para la diferenciación de las cepas no patogénicas (Pérez, 2006).

#### **2.7.5. Tratamiento:**

Hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo contra la enfermedad, sin embargo, los animales enfermos deben recibir tratamiento antibiótico para reducir la carga bacteriana o evitar las infecciones concurrentes; esto además permitirá evitar la diseminación del agente en los campos (Ameghino y De Martini, 1991). Algunos autores recomiendan el tratamiento con laxantes para permitir la eliminación del agente y sus toxinas (Ramírez, 1987).



### **2.7.6. Control y prevención:**

Luego de establecida la enfermedad en el rebaño, se recomienda rotar los dormideros y áreas de parto, sin embargo, en la práctica esto puede ser insuficiente. Algunos autores recomiendan la administración de antibióticos a todas las crías del rebaño vía oral mínimo por 3 días consecutivos (Ameghino y De Martini, 1991). Yaya y Rosadio (2005) realizaron un ensayo comparativo de tres programas de vacunación en alpacas para el control de la enfermedad, empleando una bacterina mas toxoide; los resultados mostraron una reducción significativa de la enfermedad, en los años posteriores al inicio del programa de vacunación. También existe un toxoide elaborado a base de la CPE, que produce anticuerpos anti-CPE, sin embargo, aún no se ha podido determinar su efectividad en campo (Ellis, 2006).

### **2.8. Vacunación:**

La vacunación profiláctica, ha sido ampliamente vista como un medio para combatir las infecciones; desde los inicios del uso de la vacunación contra las infecciones contra la viruela, ha demostrado su eficiencia en reducir la incidencia de infección a través de la disminución de los individuos susceptibles en una población (Heffernan y Keeling, 2009). Esto no solo se lleva a cabo con la exposición del individuo al agente sino al establecimiento de una eficiente memoria inmunológica (Baraibar, 2006).

La inmunidad protectora contra patógenos de mucosas requerirá diferentes estrategias para inducir una eficiente respuesta según las características de los patógenos involucrados. La vacunación sistémica ha demostrado ser eficiente, para muchos patógenos que tienen su lugar de ingreso vía mucosa, para muchas enfermedades, sin embargo, muchos patógenos como algunos herpesvirus, u otros patógenos intracelulares, podrían requerir el establecimiento de estrategias de vacunación vía mucosa, que permita el desarrollo de múltiples brazos del sistema inmune innato y adaptativo (Belyakov y Ahlers, 2009). En contraste a lo mencionado, algunos autores consideran que la ruta de inoculación vía mucosas sigue siendo controversial, fundamentado en la existencia de un sinnúmero de barreras, los cuales tendría que atravesar el inóculo para llevar a cabo la estimulación inmune. La barrera mucosa, como

su nombre hace referencia, impide el acceso de muchos patógenos a través de mecanismos inmunológicos y no inmunológicos, así el mismo destino podría sufrir el inmunógeno (Mestecky *et al.*, 2007).

Las vacunas diseñadas para prevenir la transmisión vía mucosas podría inducir inmunidad de células T de mucosas y sistémica. Para promover la respuesta de células T de mucosas, se están realizando numerosos estudios empleando sistemas de envío de antígenos para generación de vacunas o el uso de adyuvantes (Sistema “*delivery*”). El uso de sistemas de “*delivery*” de vacunas, imitan una infección natural vía mucosas, sin embargo, tiene un efecto principalmente una respuesta de mucosas, pero una limitada respuesta sistémica; además, que puede inducir cierto grado de tolerancia inmunológica. El uso de adyuvantes, como el uso de toxinas, como el *vibrio cholerae*, puede permitir evitar estas limitaciones, mejorando la respuesta inmune (Tan *et al.*, 2011).

## **2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

En 1983, Kary Mullis conceptualizó las más importantes de las reacciones biotecnológicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La idea fue tan simple como brillante, basado en la capacidad natural de la polimerasa para copiar ácidos nucleicos en presencia de cortos oligonucleótidos complementarios, Mullis razonó que usando una polimerasa termoestable la reacción podría ser automatizada para producir múltiples copias a través de ciclos de temperatura (Kubista, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento que permite a los investigadores copiar y amplificar segmentos específicos de ADN, millones de veces, permitiendo así manipular ADN fácilmente (Valasek y Repa, 2005), utilizando para esto segmentos de nucleótidos llamados iniciadores o cebadores, los cuales son complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a dicha secuencia, a los cuales a partir de una ADN polimerasa (generalmente Taq polimerasa), se inicia la elongación y síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador (Pinilla *et al.*, 2008).

### **2.9.1. Pasos:**

Básicamente, la reacción en cadena de la polimerasa consta de 3 pasos o etapas: Desnaturalización, alineamiento o hibridización y extensión.

#### **2.9.1.1. Desnaturalización:**

En esta primera etapa, el ADN es incubado a alta temperatura entre 94 y 95°C por un minuto. Esta temperatura busca romper los enlaces puentes de hidrógeno que une las dos hebras de ADN, separando ambas cadenas y permitiendo así, exponer las bases nitrogenadas del ADN blanco, para permitir la unión de los cebadores en el siguiente paso. Algunos investigadores recomiendan un paso de desnaturalización previa (95°C por 5 a 10 minutos) a los ciclos de amplificación para asegurar la completa separación de todas las cadenas de ADN (Torres y Baca, 1995).

#### **2.9.1.2. Alineamiento o annealing:**

En este paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas con los cebadores o iniciadores, pequeños oligonucleótidos (entre 18 a 22 oligonucleótidos) a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión de los cebadores, la cual está determinada por diversos factores (porcentaje de guanina: citocina, longitud del cavidador, etc), pero que generalmente fluctúa entre 50 y 60°C, y debe optimizarse para cada set de cebadores a usar, ya que es un factor crítico para determinar la especificidad de la prueba, a mayor temperatura los cebadores no hibridizarán y a menor temperatura se unirán inespecíficamente (Rodríguez y Barreda, 2004).

#### **2.9.1.3. Extensión:**

El tercer paso se realiza generalmente entre 72 y 74°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores en la dirección 5' a 3', añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende del tamaño de la

amplificación, debiendo estimar 1 minuto para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un alargamiento a 72°C por 5 minutos para asegurar que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan por ende la misma longitud (Rodríguez y Barreda, 2004).

## **2.9.2. Componentes de PCR:**

### **2.9.2.1. Muestra (ADN):**

El tipo de muestra puede ser ADN de diversas fuentes: animal, vegetal, bacterial o viral. Las moléculas de ARN, sean de origen viral o ARN mensajeros celulares, pueden servir como molde para amplificación solo después de su conversión en moléculas de ADN complementarias (ADNc) a través de un paso de transcripción reversa.

### **2.9.2.2. Cebadores o iniciadores:**

También denominados primers u oligonucleótidos, tienen una longitud entre 18 a 22 nucleótidos, y aproximadamente 50 a 60% de contenido G+C. Se debe tener en cuenta que los cebadores sean complementarios entre si, para evitar la formación de dímeros de cebadores. La temperatura de disociación debe ser similar para ambos cebadores debe ser similar (Valasek y Repa, 2005).

### **2.9.2.3. Cloruro de Magnesio:**

El cloruro de magnesio es un cofactor esencial de la ADN polimerasa usada en PCR y su concentración siempre debe ser optimizada. La presencia de agentes quelantes en la reacción afectan la concentración de iones de  $Mg^{2+}$ . Es por eso que la concentración total de magnesio debe exceder la de los dNTPs en la reacción (Valasek y Repa, 2005).

#### **2.9.2.4. Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs):**

Los cuatro dNTPs (dTTP, dATP, dGTP y dCTP), son las unidades básicas con los cuales se forman las nuevas cadenas de ADN, y deben encontrarse en la misma concentración (Rodríguez y Barreda, 2004).

#### **2.9.2.5. Enzima:**

La enzima que cataliza la reacción de PCR es una ADN polimerasa dependiente de ADN. Las más comúnmente usadas son la polimerasa del *Termus aquaticus* (Taq polimerasa) y la del *Termus brockianus* (Tbr polimerasa).

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un ADN específico, posibilitando su fácil identificación (Gibson *et al.*, 2008). Existen variantes de PCR como es el PCR en tiempo real, el cual permite la medición de la amplificación conforme se van realizando los ciclos de la reacción, para esto se emplean fluoróforos que emiten fluorescencia (ej. Agentes intercalantes, sondas de hibridización, etc.), la cual es directamente proporcional al ADN amplificado (Bustin, 2000; Costa, 2004).

#### **2.10. Cuantificación relativa:**

La prueba de PCR en tiempo real, es una poderosa herramienta para cuantificar la expresión de genes (Livak y Schmittgen, 2008). 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, 2008).

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: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), albúmina, actina, tubulina, 18S rRNA (Pfaffl, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Preparación de antígenos clostridiales:

##### 3.1.1. Cultivo bacteriano:

A partir de intestinos provenientes de animales muertos con sintomatología clínica de enterotoxemia, se obtuvieron muestras de contenido intestinal, las cuales sirvieron para realizar el cultivo de *Clostridium perfringens*. Las muestras fueron sembradas en medio caldo tioglicolato e incubadas en condiciones de anaerobiosis (sistema Gaspack, Anaerocult A® Merck) a 45°C por 48 horas. Posteriormente, se tomaron muestras del caldo de cultivo y se sembró en agar sangre (agar base suplementado con 5% de sangre de ovino), incubadas a 45°C por 72 horas en anaerobiosis. Las colonias de *C. perfringens* obtenidas fueron procesadas para la purificación de antígenos clostridiales y sus toxinas, las cuales fueron obtenidas a partir de los cultivos agar y en caldo tioglicolato y precipitados como se detalla a continuación.

##### 3.1.2. Purificación de proteínas:

A partir de los aislados bacterianos y los sobrenadantes de caldo (exotoxinas), se procedió a extraer las proteínas totales empleando ácido tricloroacético (TCA) en relación 1: 4 (TCA: muestra) y llevado a refrigeración por 24 horas. Posteriormente se realizó la centrifugación a 14000 RPM por 5 minutos para concentrar las proteínas precipitadas. Luego se procedió a eliminar el sobrenadante y se realizó un lavado con

acetona para eliminar los remanentes del TCA, se continuó centrifugando a 12000 RPM por 5 minutos. Luego de centrifugado, se resuspendió en PBS. El precipitado resuspendido se sometió a 3 procesos de diálisis en solución salina a 4°C. La muestra dializada se procesó para la cuantificación proteica.

### **3.1.3. Cuantificación de proteínas:**

Para determinar la cantidad de proteínas a administrar se utilizó el equipo *Quibit® 2.0 fluorometer*. Se tomó 198 µl de buffer de kit *Quibit® protein assay kit* y se colocó 2 µl del precipitado proteico. Luego de 15 minutos de incubación se determinó la concentración proteica, empleando estándares proteicos proveídos por el kit. Una vez obtenido la cantidad de proteínas, se concentró el precipitado proteico a 12.89 mg por dosis administrada, según las concentraciones proteicas utilizadas en vacunas comerciales contra enterotoxemia.

### **3.2. Preparación de ácido retinoico:**

Se utilizó la forma all-trans de ácido retinoico (Sigma Aldrich), debido a que es la forma activa de ácido retinoico. La dosis de ácido retinoico a administrar fue 0.067 mM/Kg o 25 UI/Kg según Sanhong *et al.*, 2005.

### **3.3. Análisis *in vitro*:**

Se obtuvo muestras de sangre circulante de alpacas con anticoagulante (EDTA), a partir de los cuales se obtuvieron los leucocitos sanguíneos empleando el método de gradiente de ficoll (Morgan y Darling, 1993). Los leucocitos obtenidos se colocaron en placas de cultivo celular en medio esencial mínimo (MEM) y medio L15, suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco), y penicilina al 1% (Sigma Aldrich), a razón de 300 000 células/pocillo. Así, los leucocitos fueron inoculados con 1 ml del preparado proteico/ácido retinoico, a diferentes diluciones. Las pruebas se realizaron por triplicado. Además, se emplearon controles para determinar el efecto de los tratamientos. Los ensayos se realizaron como sigue:



- Pocillo 1: Ácido retinoico (0.25 mUI) + Antígeno proteico (10ng)
- Pocillo 2: Ácido retinoico (2.5 mUI) + Antígeno proteico (1ng)
- Pocillo 3: Ácido retinoico (25 mUI) + Antígeno proteico (100pg)
- Pocillo 4: Ácido retinoico (250 mU) + Antígeno proteico (10pg)
- Pocillo 5: Control Celular (Leucocitos circulantes).

Las placas de cultivo celular fueron incubadas en estufa a 37°C, con suplemento de CO<sub>2</sub> al 5%, durante 24 horas. Posterior a la incubación, se tomó 1 ml de cada uno de los pocillos, y se procesó para la extracción de ARN totales y el posterior análisis por RT-PCR tiempo real de los ARNm de las citoquinas en estudio.

### **3.4. Análisis *in vivo*:**

#### **3.4.1. Animales de experimentación:**

En el periodo 2010 – 2012, se administró la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales a una población de 300 crías de alpacas de la zona sur del Perú (Canchis-Cusco). Los individuos tuvieron los mismos criterios de inclusión para ingresar al estudio, así se consideraron animales menores de 20 días de edad, de raza huacaya y sin signos de enfermedad intestinal al inicio del estudio. Se seleccionaron al azar 38 animales, los cuales presentaban fenotipos no deseados para la producción actual de alpacas (presencia de ojo sarco, fibra manchada, etc.). De estos individuos, se tomaron muestras de intestino (sección yeyuno) de 2 centímetros de longitud. En el diseño experimental, se consideraron también, animales no tratados, considerando los mismos criterios de inclusión que los grupos tratados. El análisis de los resultados se realizó en base a la comparación de la expresión de las citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular, de individuos tratados versus no tratados.

#### **3.4.2. Protocolo de administración:**

Las crías de alpaca fueron divididas en dos grupos principales: grupos tratados y no tratados. El protocolo comprendió la administración de dos dosis de la combinación ácido retinoico y antígeno clostridial. Las dosis consistieron de 0.067 UI/Kg de ácido

retinoico y 12.89 mg de antígeno clostridial. La administración consistió en la sujeción de los individuos seleccionados, se procedió a abrir la boca de los individuos y se administró con jeringa de 5ml el volumen del tratamiento correspondiente. Las dos dosis fueron administradas con un intervalo de una semana. Tres días posteriores a la segunda dosis, se tomaron muestras de intestino delgado, los cuales sirvieron para su procesamiento por RT-PCR en tiempo real. Cada grupo principal, a su vez se dividió en dos subgrupos: grupo 1, compuestos de individuos de 1 día de edad; y grupo 2, individuos de 7 a 14 días de edad.

### **3.5. Procesamiento de muestras:**

Inmediatamente posterior a la obtención de las muestras de intestino, se procedió a realizar un lavado en suero fisiológico tamponado (pH 7.2) para eliminar el contenido intestinal. Luego, las secciones fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento para la extracción de ARN mensajeros (ARNm) totales. Para la extracción de ARN mensajeros, se realizó un raspado profundo de la mucosa intestinal, la cual fue suspendida en 250 µl de suero fisiológico tamponado (pH 7.2) y centrifugado a 3000 RPM por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió este paso por dos veces más. El pellet obtenido fue utilizado para la extracción de ARN mensajeros.

### **3.6. Extracción de ARN mensajeros totales:**

Para evaluar la expresión de las diferentes citoquinas de la respuesta inmune celular (IFN-gamma, IL-2, TNF- $\alpha$ ) y de respuesta inmune humoral (IL-4 e IL-10), se procesaron las muestras con el kit *SV Total RNA isolation system* (PROMEGA), para la extracción de los ARN mensajeros totales. El procedimiento se detalla a continuación:

Se colocó 250 µl de las muestras en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) de 2 ml, y se le agregó 175 µl de buffer de lisis + betamercaptoetanol (BME) y se procedió a agitar por 45 segundos. Se adicionó 350 µl de buffer de dilución RDA (proveído por el kit) y se mezcló por inversión 3 a 4 veces. Se envió a centrifugación a 12000 G por 10 minutos.

Se transfirió 750 µl de sobrenadante en un tubo eppendorf libre de nucleasas. Se adicionó 200 µl de etanol al 95%. Se mezcló y se llevó a vórtex ligero. Se transfirió 700 µl de la mezcla al cartucho preinsertado al tubo de colección del kit (*SV Total RNA isolation system*). Se procedió a centrifugar a 12000 G por 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el fluido del tubo de colección. Se agregó 600 µl de solución de lavado de ARN (RWA), sobre el cartucho preinsertado. Se centrifugó a 12000 G por un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el fluido y el tubo de colección.

Se colocó el cartucho en el tubo de lavado del kit (*SV Total RNA isolation system*). Se agregó 50 µl de DNAsa, directamente a la membrana. Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se adicionó 200 µl de solución de parada de DNAsa + etanol, y se centrifugó por un minuto a 12000 G. Se añadió 600 µl de solución de lavado de ARN, luego se procedió a centrifugar a 12000 G por un minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el fluido del tubo y se agregó 250 µl de solución de lavado de ARN, centrifugándose luego por 2 minutos a temperatura ambiente.

Se eliminó el fluido y el tubo de lavado, y se colocó el cartucho en un tubo de recuperación del kit (*SV Total RNA isolation system*). Se procedió a eluir el ARN, agregando 75 µl de agua libre de nucleasa. Se dejó incubar por un minuto para luego centrifugar por dos minutos a 12000G a temperatura ambiente. Luego se procedió a alicuotar el ARN en tubos de 600 µl, cada uno con 25 µl de ARN. Se almacenó en nitrógeno líquido a -196°C, hasta su procesamiento por RT-PCR.

### **3.7. Síntesis de ADN complementario:**

Para la transcripción reversa se utilizó el kit *cDNA superscript III supermix* (INVITROGEN). El master mix se preparó como sigue:

2x RT Reaction Mix	10 µl x n
RT enzyme mix	2 µl x n
DEPC – treated water	7 µl x n

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

Se colocó 18 µl del master mix y 2 µl de muestra (ARN), para obtener un volumen de reacción de 20 µl. Las muestras fueron llevadas al termociclador donde se siguió el siguiente protocolo: 25°C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos, y luego a 4°C. Se añadió 1 µl de RNAsa H a cada pocillo y se incubó a 37°C por 20 minutos. Luego de esto se obtiene el ADN complementario que va a servir de templado para la reacción de PCR.

### **3.8. PCR en tiempo real:**

El RT-PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador equipado con un lector de fluorescencia (MJ Research – BioRad), usando el agente intercalante “Sybr green I” (Invitrogen), que se intercala entre el ADN de doble hebra, permitiendo de esta forma, la evaluación de la amplificación “ciclo por ciclo”. Para esto se utilizó el ADN complementario de los ARN mensajeros obtenidos en el paso anterior (transcripción reversa). Se emplearon los cebadores específicos de las citoquinas de la respuesta inmune celular (IFN-gamma, IL-2 y TNF- $\alpha$ ) y humoral (IL-4 e IL-10). Los cebadores se indican a continuación:

#### **Cebadores de Gliceraldehído 3 – fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Housekeeping gene):**

GAPDH (sentido)	5' GTGAAGGTCGGAGTGAACG 3'
GAPDH (antisentido)	5' GAGATGATGACCCTCTTGGC 3'

#### **Cebadores de citoquinas de la respuesta inmune celular:**

IFN – $\gamma$ (sentido)	5' ATTGTCTCCTTCTACTTCAA 3'
IFN – $\gamma$ (antisentido)	5' AGCGGAAGAGAAGTCAGAAT 3'
TNF – $\alpha$ (sentido)	5' AGCCCACGTAGTAGCAAACCC 3'
TNF – $\alpha$ (antisentido)	5' GAGAGGAGGTTGACCTTGTT 3'
IL-2 (sentido)	5' AA ACTCTCCAGGATGCTCAC 3'
IL-2 (antisentido)	5' GGA ACTGAAGGGATCTGAAA 3'

### Cebadores de citoquinas de la respuesta inmune humoral

IL-4 (sentido)	5' CAAAGAACACAACACTGAGAAG 3'
IL-4 (antisentido)	5' GGCTAAAGAAGATTATGAAG 3'
IL-10 (sentido)	5' AAGCCTTGTCGGAGATGAC 3'
IL-10 (antisentido)	5' AGCCATGAGTGAGTTCGACA 3'

Para las corridas de PCR en tiempo real, se preparó el siguiente master “mix”:

Sybr green super mix	10 µl x n
Cebador forward (10 µM)	0.4 µl x n
Cebador reverse (10 µM)	0.4 µl x n
ROX diluido (1: 10)	1 µl x n
Agua libre de nucleasas	7.2 µl x n

Luego de preparado el master mix, se procedió a dar un ligero vórtex de 2 a 3 segundos para homogenizar. Se colocó 19 µl del “mix” en tubos de PCR y 2 µl de ADN complementario (muestra). Se llevó al termociclador y se corrió el PCR con el siguiente protocolo de temperaturas:

- 50°C por 2 minutos
- 95°C por 10 minutos
- 40 ciclos de:
  - 95°C por 15 segundos
  - 60°C por 1 minutoLectura de Placa (Read plate)
- Temperatura de disociación: de 65 – 90°C con incrementos de 0.2°C cada 0.3 s
- 4°C forever.

Los resultados fueron observados y analizados utilizando el programa Opticon Monitor 2.1. (MJ Research – BioRad).

### **3.9. Cuantificación relativa:**

Con las curvas de amplificación de los productos obtenidos de cada una de las muestras de las pruebas *in vitro* e *in vivo*, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de las citoquinas analizadas. Para esto, se empleó el método del Ct comparativo o  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  (Livak y Smittngen, 2001), obtenidas de las muestras de intestino. El análisis se realizó comparando las curvas de amplificación de los individuos tratados versus los individuos no tratados.

### **3.10. Análisis estadístico:**

Para las pruebas *in vivo*, se determinó si las variables a analizar seguían la distribución normal, empleando la prueba de Shapiro Wilk. Para estimar si las diferencias entre los individuos tratados en comparación con los no tratados, y el análisis según grupo etario, fueron estadísticamente significativas, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los resultados se presentan como la mediana de las variables, y los rangos promedios de cada una de las variables fueron utilizados para realizar el análisis estadístico. Todas las pruebas fueron realizadas en el programa estadístico STATA 12.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Análisis *in vitro*:**

#### **4.1.1. Expresión de Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH):**

El análisis de expresión de los leucocitos tratados con la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales *in vitro*, evidenció la expresión de GAPDH en todas las diluciones del tratamiento. Además, se detectó la presencia de un solo pico en el gráfico de la temperatura de disociación, la cual fue de 81.5 °C. Los valores de curva de amplificación y temperatura de disociación se observan en las figuras A1 y A2. Estos resultados sirvieron como control de la muestra en la cuantificación relativa.

#### **4.1.2. Expresión de TNF- $\alpha$ :**

A partir de los leucocitos tratados se realizó la extracción de ARN mensajeros para medir la expresión de TNF- $\alpha$ . Los resultados muestran que todos los leucocitos tratados evidenciaron la formación de una curva de amplificación (Ct) de los productos. La temperatura de disociación (Tm), la cual fue de 86.3 °C, evidencia un producto único amplificado. Las figuras se muestran en las figuras A3 y A4.

El análisis de cuantificación relativa muestra un nivel de expresión de 0.75 veces respecto al calibrador (control celular) para la combinación de 10 ng de antígenos clostridiales (ag) y 0.25 mUI de ATRA; continuando con una expresión creciente en las siguientes combinaciones (1.57 veces en la combinación 1 ng de ag y 2.5 mUI de ATRA; y 5.03 veces en la combinación 100 pg de ag y 25 mUI de ATRA), llegando a su máxima expresión 10.27 veces en la combinación de 10 pg de ag y 250 mUI de ATRA (Fig. 2). La cuantificación relativa de la expresión de TNF- $\alpha$  en los grupos tratados indica una relación directa positiva a la concentración de ATRA, mientras que hay una relación directa negativa con la concentración de Ag clostridial.

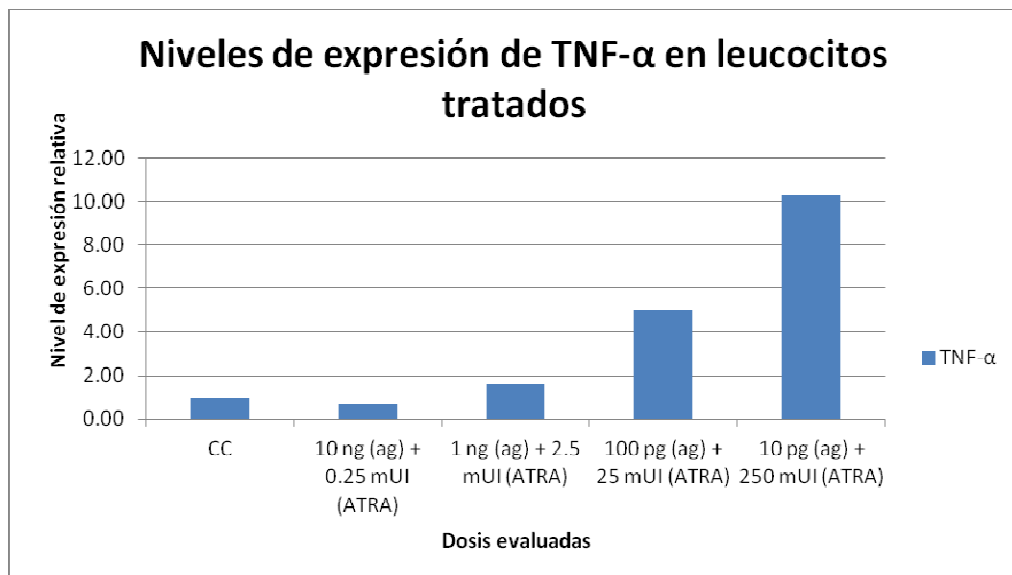


Figura 2. Niveles de expresión de TNF- $\alpha$  en leucocitos tratados con la combinación de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA) a diferentes dosis.

#### 4.1.3. Expresión de IFN- $\gamma$ :

Los resultados de los RT-PCR en tiempo real para el gen IFN- $\gamma$  de los leucocitos tratados indican que las muestras poseen una curva de amplificación y una temperatura de disociación de 85.2 °C, lo que evidencia un producto único amplificado. Los gráficos de curvas de amplificación y temperatura de disociación se observan en las figuras A5 y A6.



El análisis de cuantificación relativa de la expresión de ARN mensajeros de IFN- $\gamma$ , a partir de leucocitos inoculados con la combinación de antígenos clostridiales y ácido retinoico; muestra una expresión relativa mayor de 8 veces la expresión del calibrador (cultivo celular de leucocitos no tratados) a una combinación de 100 pg de Ag y 25 mUI de ATRA, siguiendo una expresión de 1.82 veces el calibrador para la combinación de 10 ng de ag y 0.25 mUI de ATRA. Se observa una expresión menor de 0.09 veces del calibrador a las concentraciones de 1 ng de ag y 2.5 mUI de ATRA y para la combinación 10 pg de ag y 250 mUI de ATRA no se pudo determinar expresión de ARN mensajeros, por lo tanto no se determinó cuantificación alguna para esta combinación (Fig. 3).

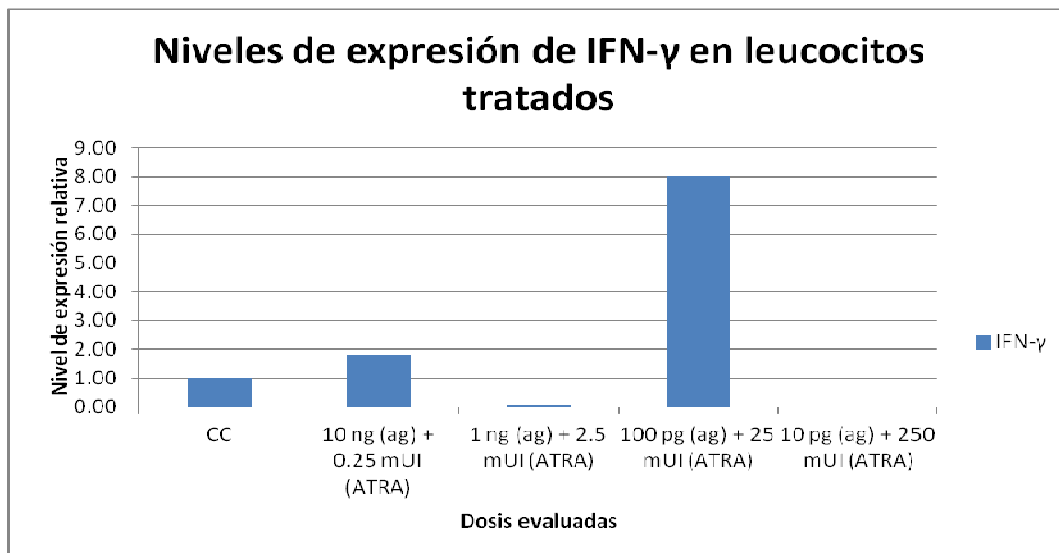


Figura 3. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en leucocitos tratados con diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). CC = control celular (calibrador), ag = antígeno clostridial, ATRA= Ácido retinoico all-trans.

#### 4.1.4. Expresión de IL-2:

Se determinó la expresión de IL-2, los cuales muestran una curva de amplificación y una temperatura de disociación de 77.0 °C, lo que evidencia un producto específico único. Las figuras de curva de amplificación y temperatura de disociación se muestran en las figuras A7 y A8.

El análisis de cuantificación relativa de los ARN mensajeros del gen IL-2 muestra un nivel de expresión de 2.22 veces el calibrador (control celular de leucocitos no tratados) para la concentración de 10 ng de ag y 0.25 mUI de ATRA y de 2.33 veces para la concentración de 1 ng de ag y 2.5 mUI de ATRA, llegando a su nivel máximo de expresión a la combinación de 100 pg de ag y 25 mUI de ATRA con 5.58 veces el calibrador. A la combinación de 10 pg de ag y 250 mUI de ATRA, no se pudo determinar expresión de ARN mensajeros por la prueba utilizada, por lo tanto no se determinó cuantificación alguna. La cuantificación relativa de la expresión de IL-2 en los grupos tratados indica una relación directa positiva a la concentración de ATRA hasta la concentración de 100 pg de Ag y 25 mUI de ATRA, no pudiéndose detectar ARNm de IL-2 a una concentración mayor de ATRA (250mUI); mientras que hay una relación directa negativa con la concentración de Ag clostridial (Fig. 4).

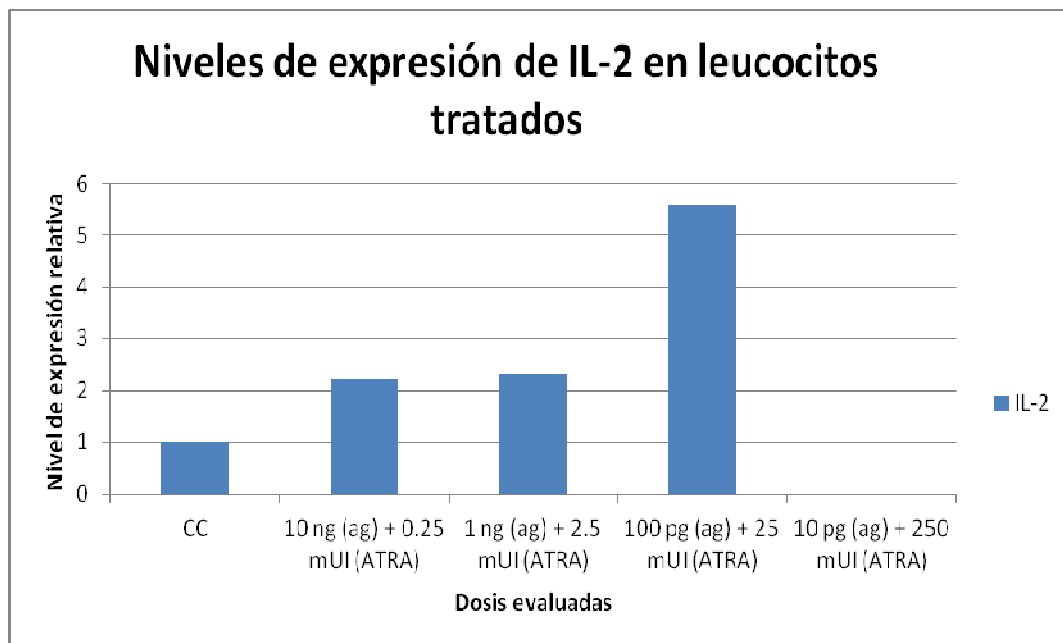


Figura 4. Niveles de expresión de IL-2 en leucocitos tratados con diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). CC = control celular (calibrador), ag = antígeno clostridial, ATRA= Ácido retinoico all-trans.

#### 4.1.5. Expresión de IL-10:

Los resultados de la evaluación de la expresión de IL-10, en los leucocitos tratados muestran curvas de amplificaciones. La temperatura de disociación muestra un producto

único amplificado cuya temperatura es de 77 °C. Las figuras A9 y A10 muestran las curvas de amplificación y temperatura de disociación para IL-10, respectivamente.

El análisis de cuantificación relativa de ARN mensajeros del gen de IL-10 muestra un nivel de expresión de 3.14 veces el calibrador, para la dosis de 10 ng de ag y 0.25mUI de ATRA. Se detectó la mayor expresión de IL-10 a la dosis de 1 ng de ag y 2.5 mUI de ATRA, con 6.23 veces; para luego descender en las siguientes dosis (100 pg de ag y 25 mUI de ATRA, y en 10 pg de ag y 250 mUI de ATRA) con 5.39 y 0.37 veces respectivamente (Fig. 5).

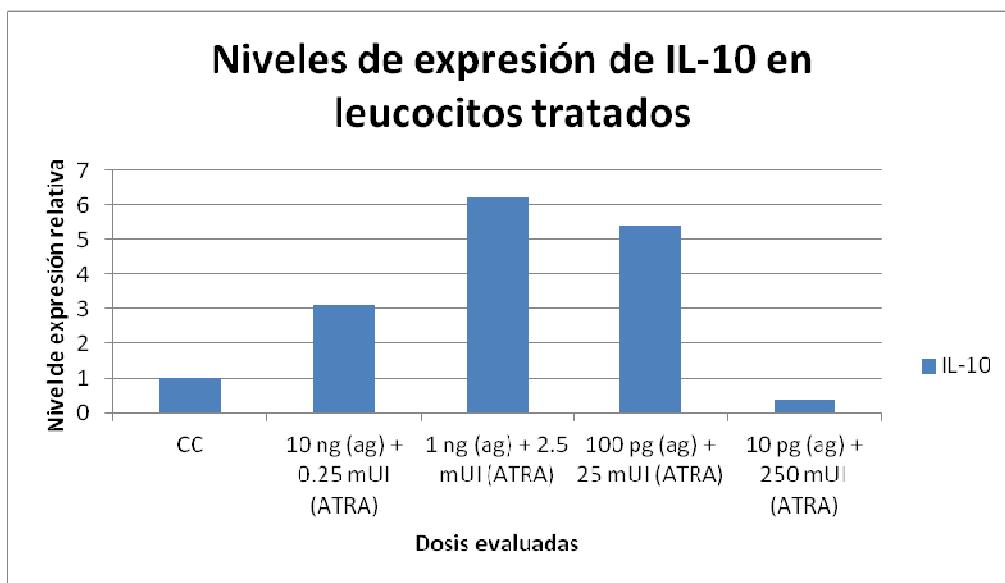


Figura 5. Niveles de expresión de IL-10 en leucocitos tratados con diferentes concentraciones de antígenos clostridiales y ácido retinoico (ATRA). CC = control celular (calibrador), ag = antígeno clostridial, ATRA= Ácido retinoico all-trans.

## 4.2. Análisis *in vivo*:

### 4.2.1. Expresión de Glicer aldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH):

Las corridas de PCR en tiempo real, empleando los cebadores para el gen GAPDH, mostraron una curva de amplificación para el 100 % de las muestras de tejido intestinal. Así, se determinó las curvas de amplificación y la temperatura de disociación de los

productos amplificados fue de 83.9 °C. Las figuras de las curvas de amplificación y temperatura de disociación se muestran en las figuras A11 y A12.

Se estimó si las variables a analizar se distribuyen de forma normal, mediante la prueba de Shapiro Wilk. Los resultados muestran que ninguno sigue la distribución normal (Ver apéndice).

#### **4.2.2. Expresión de IFN- $\gamma$ :**

Se realizaron las corridas de RT-PCR en tiempo real, utilizando los cebadores para el gen IFN- $\gamma$ . Se determinaron las curvas de amplificación y las temperaturas de disociación de los productos amplificados fueron de 85.2 °C. Los gráficos de curva de amplificación y temperatura de disociación se muestran en las figuras A13 y A14.

El análisis de cuantificación relativa para estimar los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en cada una de las muestras mostró una mediana de 874.6 para los individuos no tratados y 4495.9 para los individuos tratados (Fig. 6). Los rangos promedios de 8.071 para los individuos no tratados y 20.928 para los individuos que recibieron tratamiento (Cuadros A1 y A2).

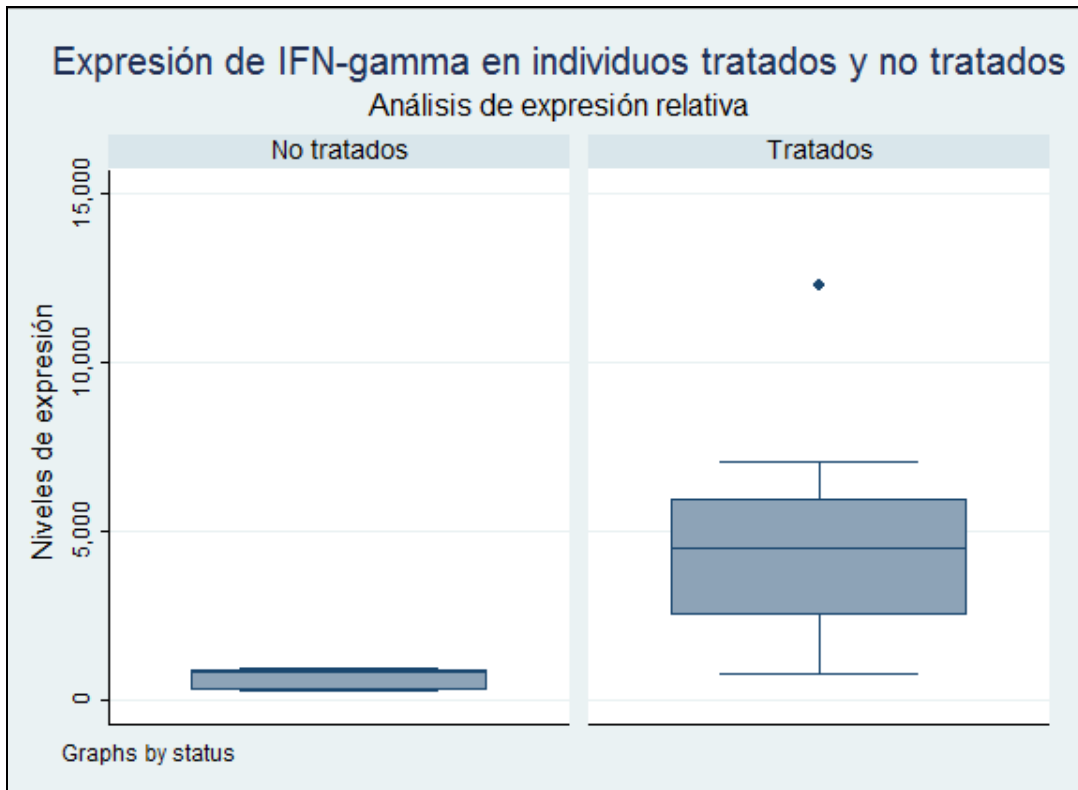


Figura 6. Expresión relativa de IFN- $\gamma$  entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.

Se realizó el análisis considerando el grupo etario, así para el grupo 1, se encontró una mediana de 296.12 en los niveles de expresión de los individuos no tratados y 2503.97 para los tratados. El rango promedio fue de 3.5 para los individuos sin tratamiento y 10.5 para los que recibieron tratamiento. En el grupo de 7-14 días, la mediana de los niveles de expresión fue de 910.4 para los individuos no tratados y 6344.6 para los individuos que recibieron tratamiento (Fig. 7). El rango promedio de los individuos que no recibieron fue de 4.5 y 11.5 para los individuos que recibieron tratamiento (Cuadros A1 y A2).

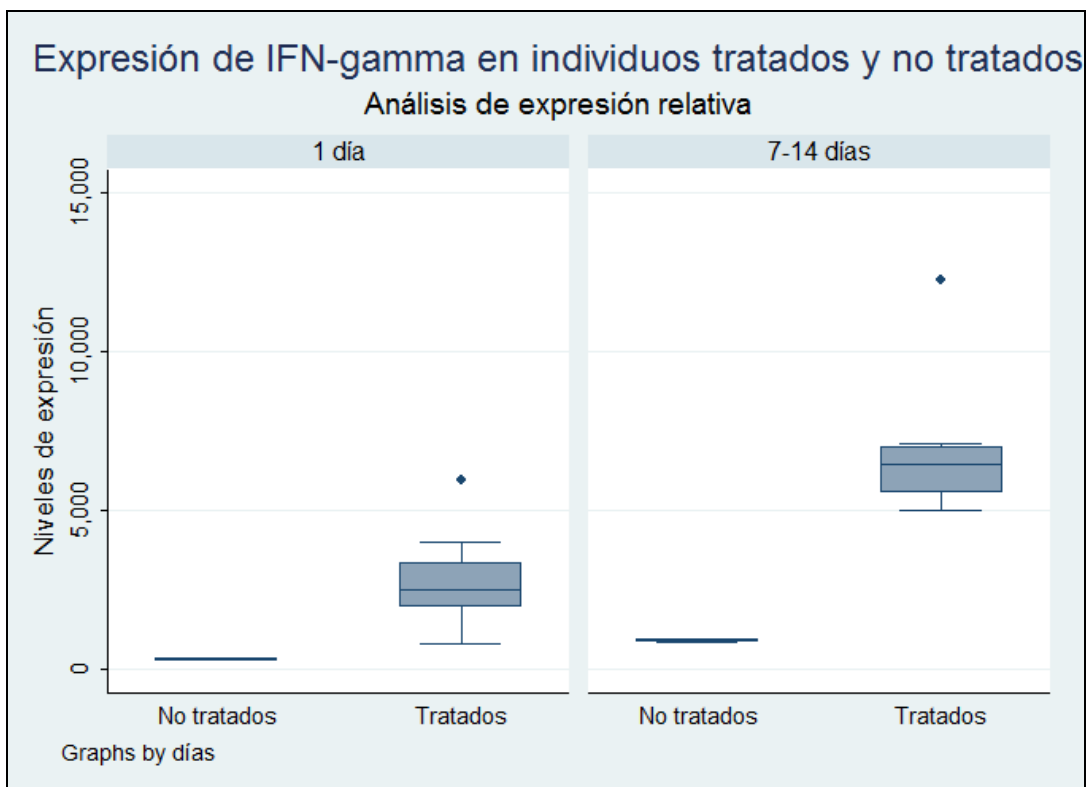


Figura 7. Expresión relativa de IFN- $\gamma$  entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.

#### 4.2.3. Expresión de TNF- $\alpha$ :

Se realizaron corridas de RT-PCR en tiempo real, para evaluar la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), empleando cebadores específicos. Los resultados revelan un producto específico único y además, se determinó las curvas de amplificación y se encontró una temperatura de disociación de los productos amplificados de 86.3 °C. Los gráficos se muestran en las figuras A15 y A16. El análisis de cuantificación relativa muestra una mediana de 12.9 para los individuos no tratados y 115.9 para los individuos tratados (Fig. 8). Los rangos promedios de los individuos no tratados fueron de 12.063 y 20.936 para los individuos tratados (Cuadros A1 y A2).

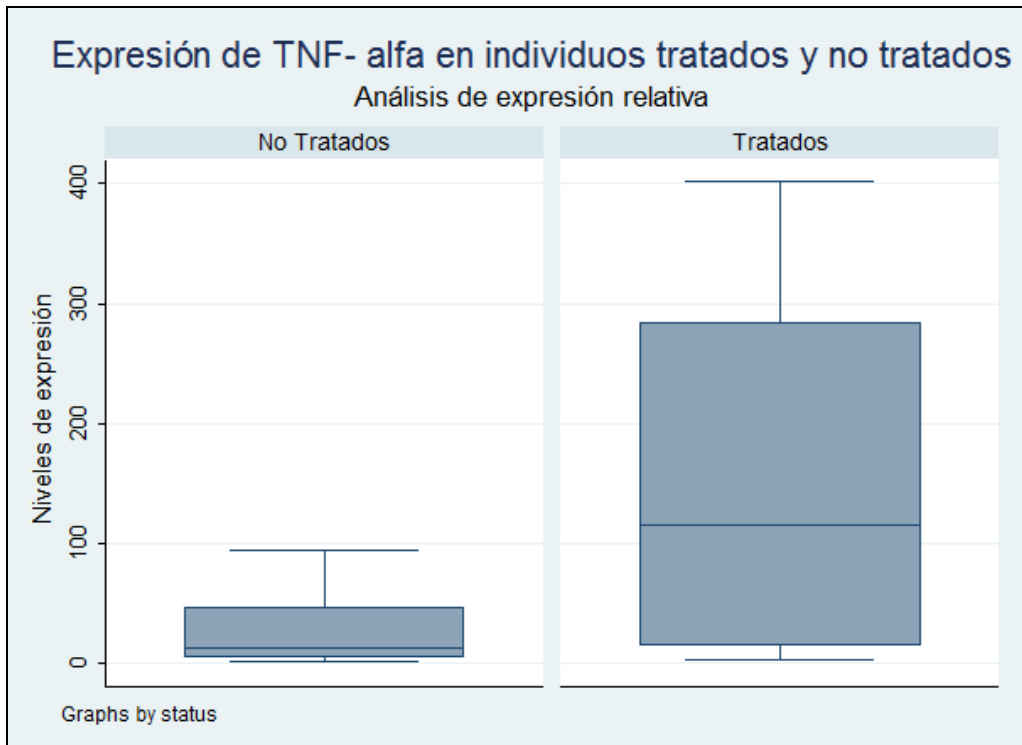


Figura 8. Expresión relativa de TNF- $\alpha$  entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.

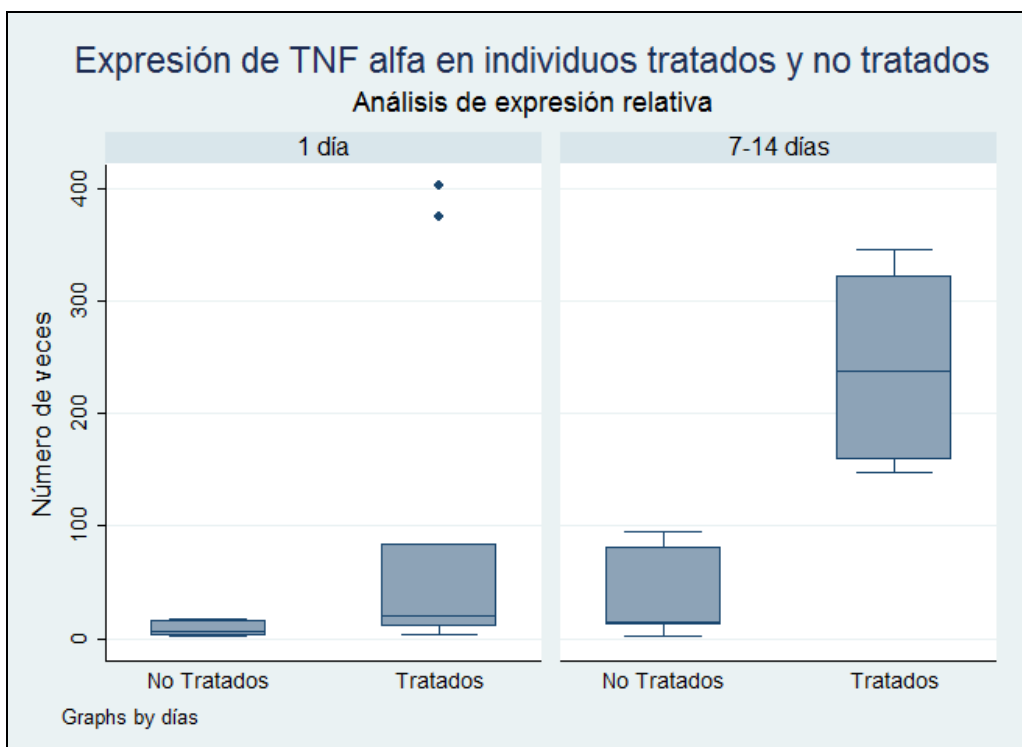


Figura 9. Expresión relativa de TNF- $\alpha$  entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.

La fig. 9 muestra los niveles de expresión de TNF-alfa en los individuos tratados en comparación con los no tratados, según grupo etario. Así podemos encontrar que para el grupo de 1 día tenemos una mediana de 6.64 para los individuos no tratados y 20.125 para los individuos tratados. Los rangos promedios fueron de 5.5 y 10.3 respectivamente. Para los individuos del grupo 2 (7-14 días), se obtuvo una mediana de 14.935 para los individuos no tratados y 237.35 para los tratados. Los rangos promedios fueron de 5.5 y 10.125 respectivamente (Cuadros A1 y A2).

#### 4.2.4. Expresión de IL-2:

Realizadas las corridas de RT-PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-2, se muestra un producto específico evidenciados por una curva de amplificación y una temperatura de disociación, la cual fue de 77.0°C (Figuras A17 y A18). El análisis de cuantificación relativa muestra una mediana de 45.3 para los individuos no tratados y de 104.9 para los individuos tratados, en comparación con el grupo calibrador (Fig. 10). Los rangos promedios fueron 13.9 y 21.5 respectivamente.

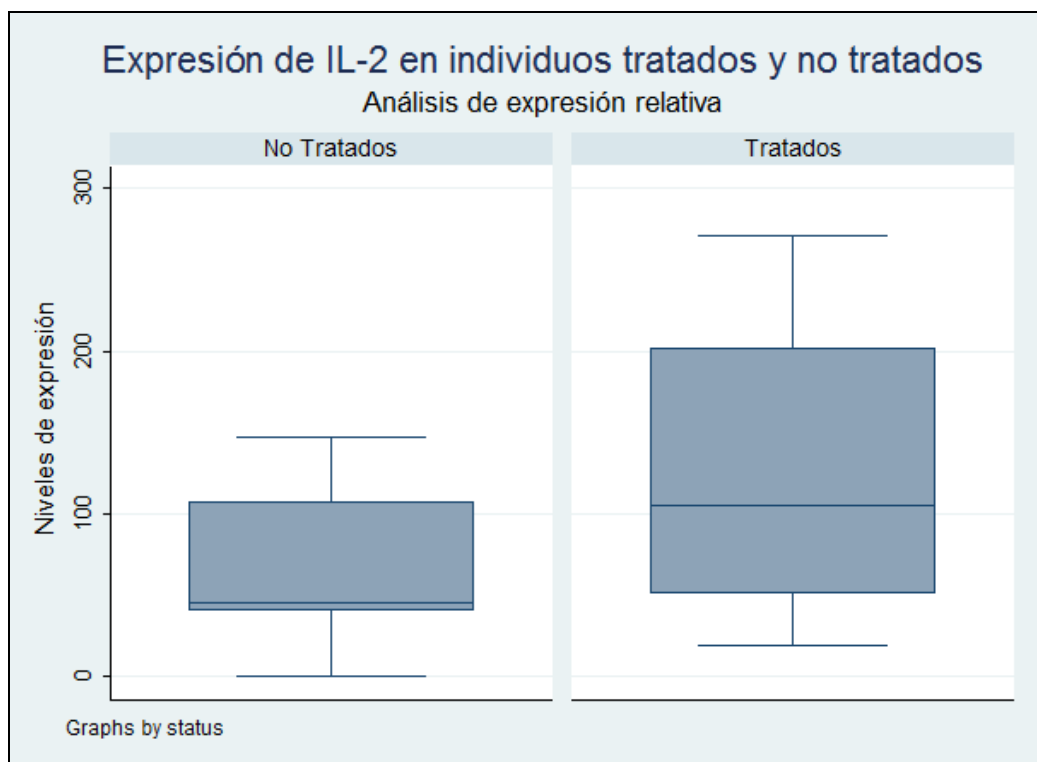


Figura 10. Expresión relativa de IL-2 entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.



Considerando el análisis de según grupo etario, los resultados muestran una mediana de 131.5 en los individuos que no recibieron tratamiento y 104.9 en los tratados, para el grupo de 1 día; los rango promedios fue de 9.5 para los dos grupos, no existiendo diferencia entre los grupos ( $p=1.0000$ ). En el grupo de 7 – 14 días, se encontró una mediana de 40.8 para los individuos que no recibieron tratamiento y 152.4 para los individuos tratados, encontrándose diferencia estadística significativa ( $p=0.0153$ ) (Fig. 11). Los rangos promedios fueron 6.8 y 13.5 respectivamente (Cuadros A1 y A2).

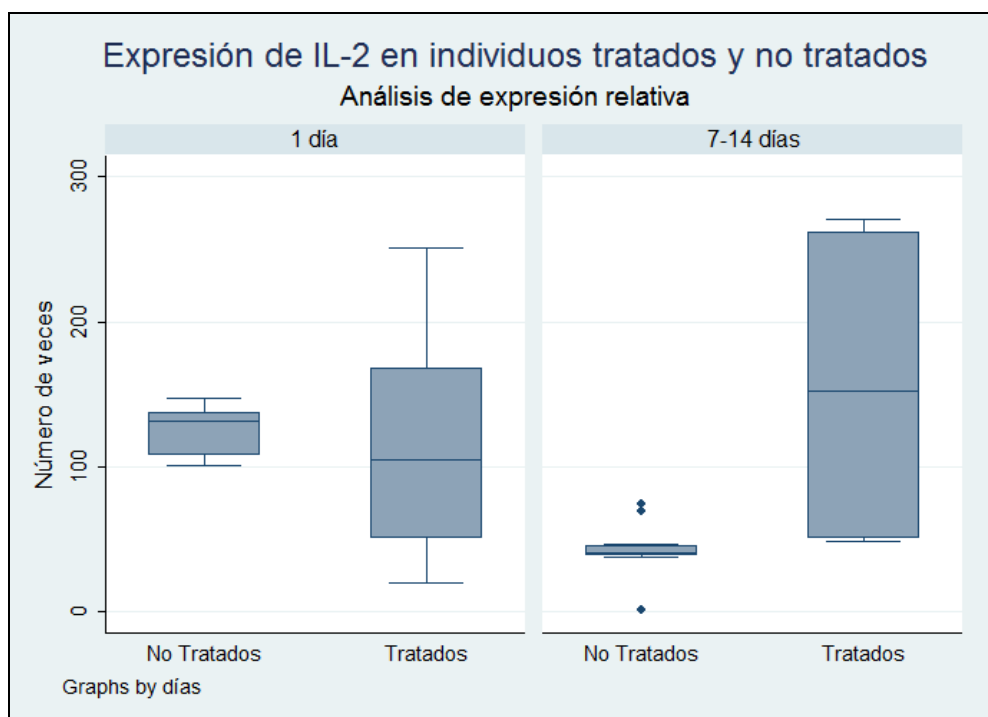


Figura 11. Expresión relativa de IL-2 entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.

#### 4.2.5. Expresión de IL-4:

Los resultados de la evaluación de expresión de IL-4 mostraron un producto específico único evidenciado por una curva de amplificación y con una temperatura de disociación de 74.8°C. Los gráficos se muestran en las figuras A19 y A20.

Se realizó además, el análisis de cuantificación relativa para estimar los niveles de expresión de IL-4 en cada una de las muestras. El análisis mostró una mediana de 211.2

para los individuos que no recibieron tratamiento y 179.9 para los individuos tratados. Los rango promedios fueron de 14.46 y 14.54 respectivamente. No se observó diferencia estadística significativa entre los grupos tratados en comparación con los no tratados ( $p=0.9815$ ) (Fig. 12).

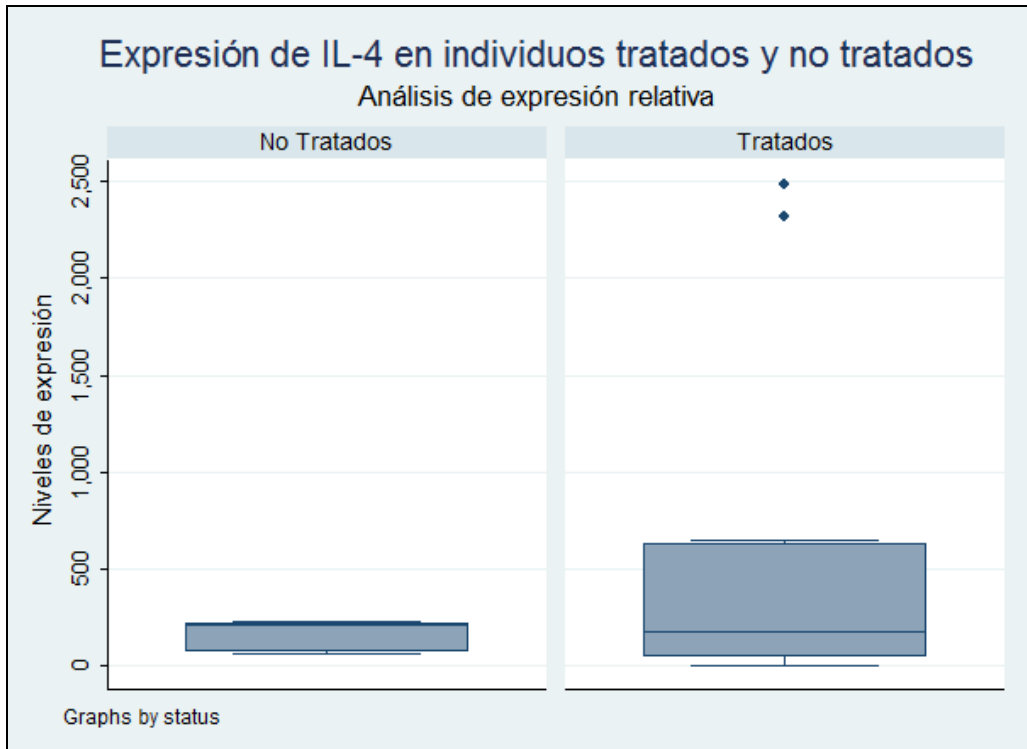


Figura 12. Expresión relativa de IL-4 entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.

Se realizó el análisis considerando el grupo etario, para el grupo 1, se encontró una mediana de 68.3 para los individuos que no recibieron tratamiento y 52.1 para los que recibieron tratamiento. Los rangos promedios fueron de 9.4 y 6.1 respectivamente. En el grupo de 7-14 días, se encontró una mediana de 216.8 para los individuos que no recibieron tratamiento y 1486.4 para los que recibieron tratamiento (Fig. 13). Los rango promedios fueron de 5.5 y 12.5 respectivamente (Cuadro A1 y A2).

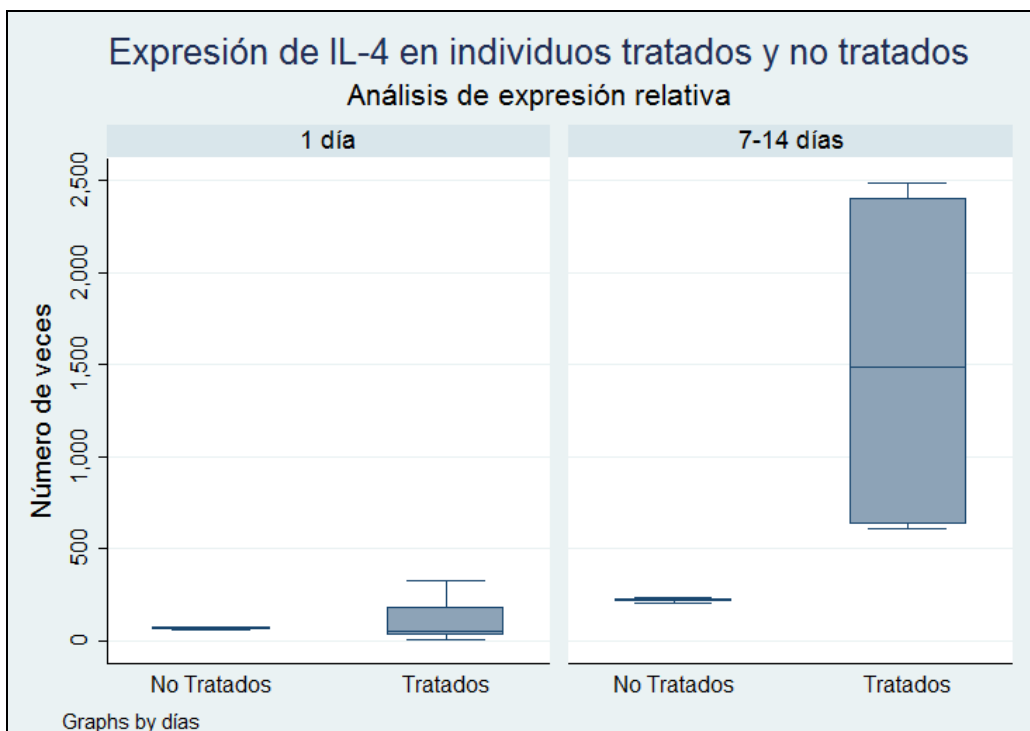


Figura 13. Expresión relativa de IL-4 entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo.

#### 4.2.6. Expresión de IL-10:

Realizadas las corridas de RT-PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-10, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación y la temperatura de disociación de los productos amplificados el cual fue de 75.1°C (Figuras A21 y A22).

El análisis de cuantificación relativa muestra una mediana de 306.1 para los individuos que no recibieron tratamiento y 515.4 para los individuos que si la recibieron. Los rangos promedios fueron de 16.5 y 20.1, respectivamente (Fig. 14).

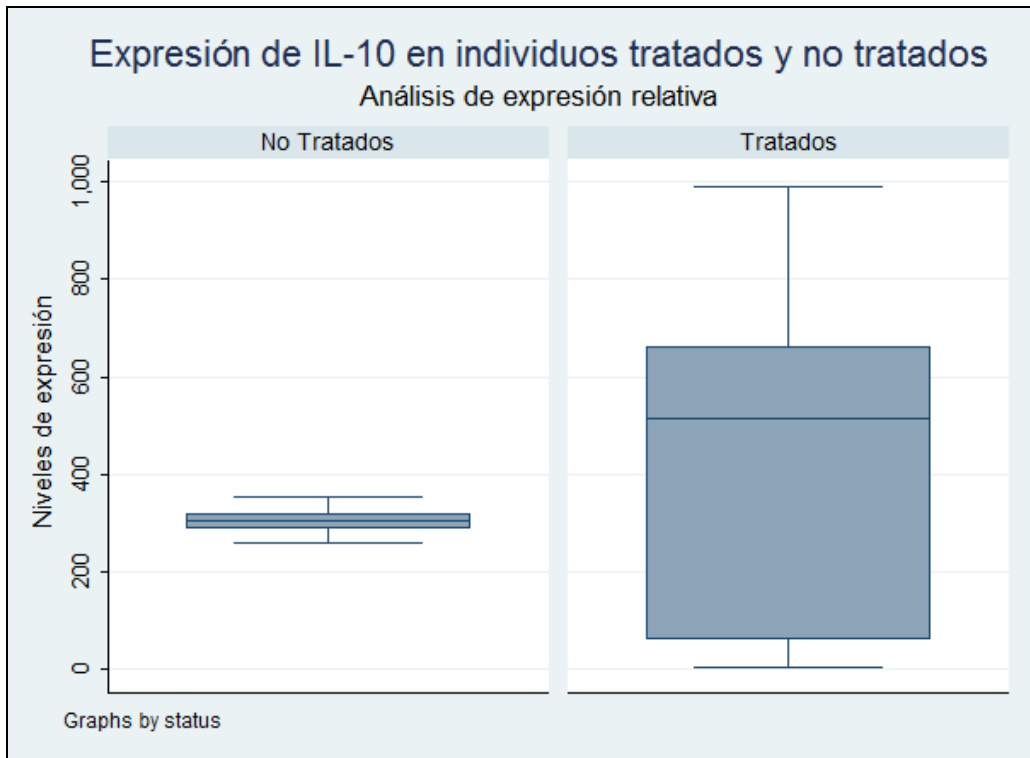


Figura 14. Expresión relativa de IL-10 entre los individuos tratados y no tratados, según el método del Ct comparativo.

Considerando el análisis de según grupo etario. Para el grupo 1, los resultados muestran una mediana de 292.6 para los individuos que no recibieron tratamiento y 253.5 para los individuos que recibieron tratamiento. Los rangos promedios fueron de 9.5 para ambos grupos. En el grupo de 7 – 14 días, se encontró una mediana de 309.8 para los individuos que no recibieron tratamiento y 773.1 para los individuos que recibieron tratamiento. Los rangos promedios fueron de 7.5 y 12. No se encontró diferencia estadística significativa para ninguno de los grupos evaluados (grupo 1 día  $p=1.0000$ ; grupo 7-14 días  $p=0.0754$ ) (Fig. 15).

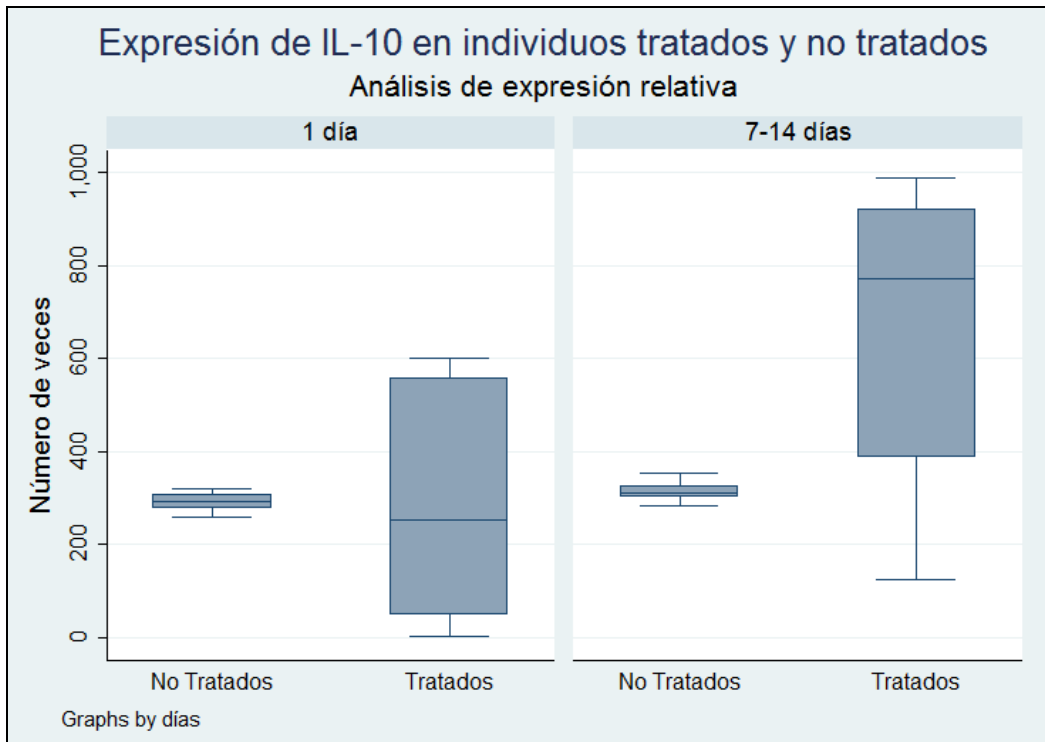


Figura 15. Expresión relativa de IL-10 entre los individuos tratados y no tratados, según grupo etario. El análisis se realizó empleando el método del Ct comparativo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon.

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó una evaluación del efecto de la combinación del ácido retinoico (una sustancia inmunoestimulante), y los antígenos proteicos del *Clostridium perfringens* causante de enterotoxemia en crías de alpacas, en el estímulo a una respuesta inmune en la mucosa intestinal.

En las pruebas *in vitro*, la expresión del gen GAPDH, fue detectada en todos los tratamientos mediante la prueba de RT – PCR tiempo real, lo que demuestra que ninguna de las concentraciones utilizadas en el presente trabajo, ejerció un efecto citotóxico sobre los leucocitos inoculados, y que la integridad y viabilidad de los leucocitos y que éstos pueden servir para el análisis de expresión de otros genes, como los de las citoquinas de la respuesta inmune tanto humoral y celular tal como lo señalan Schmittgen y Livak (2008).

En los animales muestreados se realizó las extracciones de ARN mensajeros de las muestras de intestino de los animales tratados y de los animales que no recibieron tratamiento, para evaluar el efecto de la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales administrados a doble dosis, para cada grupo etario. En primer lugar se determinó la expresión del gen GAPDH, el cual sirvió para estimar la viabilidad de las muestras, y además, para la normalización de las muestras en el proceso de cuantificación relativa (Schmittgen y Livak, 2008). Los resultados mostraron una homogeneidad en las curvas de amplificación obtenidos para todas las muestras analizadas. Es importante mencionar además, que parte de las muestras de los

individuos que no recibieron tratamiento fueron utilizadas por Chiok, en el 2012, en un estudio para evaluar la expresión normal de las principales citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular en individuos sanos, en comparación con los niveles de expresión de individuos enfermos.

Para el caso del análisis *in vivo*, debido a que el objetivo del estudio fue determinar diferencias en expresión de las citoquinas analizadas, la perspectiva inicial fue emplear la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) o la prueba de t de student. Para considerar emplear estas pruebas, primero fue necesario determinar dos parámetros importantes 1) el tamaño de muestra, y 2) la distribución de las muestras. El número de muestras analizadas fue reducido (n=20 para el grupo tratado; n=18 para el grupo no tratado). La distribución de las muestras se estimó mediante la prueba de Shapiro wilk en el programa estadístico STATA, encontrándose que ninguna variable seguía la distribución normal. Debido a esto, se optó por emplear la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney-Wilcoxon. En esta prueba el análisis se basa en la comparación de las sumas de rangos medios obtenidos para cada grupo analizado, (no en las medias como en las pruebas paramétricas) y que es la óptima cuando las muestras no siguen la distribución normal o el tamaño de la muestra es reducido (McElduff *et al.*, 2005).

Se evaluó la expresión de IFN-gamma, en los leucocitos inoculados con las combinaciones de ácido retinoico y antígeno clostridial, encontrándose una máxima expresión relativa a la concentración de 100 pg de antígeno clostridial y 25 mUI de ATRA, lo que demuestra que al ácido retinoico en combinación con antígeno clostridial puede incrementar los niveles de expresión de IFN-gamma, como se demostró en un ensayo realizado para evaluar el efecto de la vitamina A sobre la expresión de IL-4 e IFN-gamma en células epiteliales de origen humano (Sarkar *et al.*, 1998; Ertesvag *et al.*, 2002). No se pudo determinar la expresión de IFN- $\gamma$  a la combinación de 10 pg de antígeno clostridial y 250 mUI de ATRA, esto confirma que existe un efecto directo sobre la supresión en la expresión de IFN-gamma. Diversos estudios mencionan que esto podría deberse a que a altas dosis de ácido retinoico se produce un efecto supresor de la respuesta Th1, principalmente de la expresión de IFN-gamma, tal como lo encontrado en estudios realizados para evaluar el efecto de

desarrollo de Th1/Th2 de ATRA sobre leucocitos de ratones (Iwata *et al.*, 2003, Ma *et al.*, 2005).

La expresión de ARN mensajeros de cada una de las muestras en el análisis *in vivo*, permite establecer que existe una mayor expresión de IFN-gamma, en los individuos tratados en comparación con los individuos que no recibieron tratamiento. Esto permite afirmar que la concentración empleada de ácido retinoico y antígeno clostridial es la adecuada para estimular una mayor expresión de IFN-gamma; en contraposición a otros estudios realizados en roedores que encuentran una reducción en la expresión, pero como los mismos autores mencionan, este efecto es debido a la alta concentración utilizada (Ma *et al.*, 2005). Además, el tratamiento empleado en el presente estudio, utiliza antígenos clostridiales, así como sus toxinas, lo que permitiría ejercer ese efecto estimulante sobre los agregados linfoides del tracto intestinal, que se encuentran en desarrollo (Roca, 2011). En ese contexto, se han realizado estudios en los cuales se demuestra que existe un efecto directo de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) sobre leucocitos cultivados *in vitro*, e incluso encontrando un efecto estimulante en estudios *in vivo*, incrementando los niveles de expresión de IFN-gamma (Wallace *et al.*, 1999). A su vez, se ha demostrado la capacidad del ácido retinoico (ATRA) de estimular diferentes factores transcripcionales como STAT-1, el principal factor transcripcional de IFN-gamma, t-bet y NF- $\kappa$ B que promueven el desarrollo de una respuesta Th1 y el aumento de la expresión de IFN-gamma, ya que la interacción STAT-1/NF- $\kappa$ B favorece la estimulación de elementos promotores en los genes nucleares uno de los cuales es el factor regulador del interferon (IRF-1) (Spilianakis *et al.*, 2005; Schroeder *et al.*, 2004; Luo y Ross, 2006).

Haciendo las comparaciones por grupos etario, se pudo observar que la expresión de IFN-gamma, en los individuos de 1 día, no se ve afectado por la administración de la combinación de ácido retinoico y antígeno clostridial; en contraposición, a lo encontrado en los individuos del grupo 2 (7-14 días), en donde se pudo establecer que existe una mayor expresión en los individuos que recibieron el tratamiento. Este resultado podría deberse a que el tejido linfoides asociado a mucosas en las especies mamíferas se encuentra aún en desarrollo posterior al nacimiento, y en las alpacas este desarrollo continúa en las primeras semanas; a diferencia de los individuos del grupo 2,



los cuales fueron muestreados en promedio a la tercera semana de edad, edad en la cual existe un sistema inmune mucho más establecido y desarrollado (Roca, 2011).

En el análisis de expresión *in vitro*, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), se puede observar una expresión creciente hasta la concentración de 10 pg de antígeno clostridial y 250 mUI de ATRA, lo que demostraría que la expresión de TNF- $\alpha$ , se incrementa según las concentraciones de ácido retinoico y que a ninguna concentración se encontró reducción de su expresión. Esta mayor expresión se debe a la activación del gen del receptor I - inducible por ácido retinoico (RIG-I), una proteína helicasa que permite el incremento de la expresión de TNF- $\alpha$ , como lo demostró Wang *et al.*, 2008, cuando evaluó la expresión de RIG-I en macrófagos inoculados con lipopolisacárido (LPS). Este incremento puede deberse también a la capacidad del ácido retinoico de incrementar la expresión del receptor de TNF- $\alpha$  (TNR) en los leucocitos lo que debido a un efecto sinérgico incrementaría la expresión de TNF- $\alpha$  (Tobler *et al.*, 1987; Witcher *et al.*, 2003).

En el análisis de expresión de TNF-alfa en el análisis *in vivo*, se pudo establecer una mayor expresión en los individuos tratados en comparación con los individuos que no recibieron tratamiento, podría deberse a la capacidad de los antígenos bacterianos de activar la vía de señalización de  $\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ , un complejo activador transcripcional, que permite desencadenar la expresión de TNF-alfa, en células epiteliales intestinales (Jobin y Sartor, 2000). Además, el ácido retinoico, en su forma all-trans, posee la capacidad de activar el receptor inducible de ácido retinoico (RIG-1) a través de la activación de TLR4 en células presentadoras de antígenos, permitiendo estimular la expresión de TNF-alfa (Wang *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la secreción de TNF-alfa en células estimuladas por antígenos bacterianos y ácido retinoico estimula la expresión del receptor de TNF-alfa (TNR) y por un efecto de sinergia incrementa la expresión TNF-alfa (Wobler *et al.*, 1987). Diversos estudios mencionan que puede existir un efecto inhibitorio de TNF-alfa producido por la administración de ácido retinoico, sin embargo, ésta es dosis dependiente, encontrando que a dosis elevada se produce este efecto depresor (Mehta *et al.*, 1994). En el presente estudio la dosis evaluada es inferior a la empleada (en términos de mUI) en los estudios mencionados, lo que explica el efecto positivo de la expresión de TNF-alfa. Cabe mencionar también, que en el

tratamiento de ácido retinoico utilizada por Mehta *et al.*, 1994, no se emplean otros componentes que puedan ejercer un efecto positivo, como lo realizarían los antígenos clostridiales. Debido a esto, el efecto estimulante puede deberse también a la combinación con éstos antígenos proteicos.

En el análisis por grupo etario encontramos que la expresión de TNF-alfa, en el grupo 1, no se ve afectado ( $p=0.0509$ ) por el tratamiento y esto puede deberse a que existe un efecto inhibitorio de otras citoquinas (por ejemplo IL-10), que puedan estar involucradas en la supresión de la expresión de TNF-alfa en los individuos tratados, con el objetivo de mantener la homeostasis intestinal, a través de la promoción y activación de linfocitos T reguladores; lo cual ha sido demostrado en otros estudios (Meador *et al.*, 2008). Para el caso de los individuos del grupo 2, los niveles de expresión se ven influenciados positivamente debido al tratamiento ( $p=0.0011$ ), es decir, los niveles de expresión se incrementan; al parecer existe una respuesta mejorada frente al tratamiento en los individuos que poseen mayor edad, debido a que el sistema inmune intestinal se encuentra en un desarrollo avanzado, y por lo tanto en la capacidad de responder de forma mucho más eficiente frente a los diferentes estímulos.

Para el caso de IL-2, se encontró una expresión incrementada desde la combinación de 10 ng de antígeno clostridial y 0.25 mUI de ATRA; llegando a su máxima expresión en la combinación 100 pg de antígeno clostridial y 25 mUI de ATRA. En la combinación de 10 pg de antígeno clostridial y 250 mUI de ATRA, no se pudo determinar la expresión de IL-2 por RT – PCR tiempo real. Una explicación a esto es debido a la capacidad que posee el ácido retinoico *all-trans* de incrementar los niveles de expresión de IL-2 en linfocitos T, así como los niveles de su receptor IL-2R (Erstevag *et al.*, 2002; Engedal *et al.*, 2004, 2006). Además, se ha demostrado que IL-2 puede promover la expresión de otras citoquinas de la respuesta humoral y celular (Iwata *et al.*, 2003). Diversos estudios mencionan que a bajas concentraciones de ácido retinoico, la respuesta puede ser menos evidente, tal y como lo encontramos en nuestros resultados la máxima expresión de IL-2 se evidenció notoriamente a la concentración de 25mUI de ATRA.

Para el análisis *in vivo* de IL-2, existe diferencia ( $p=0.0272$ ) entre los individuos tratados y no tratados, mostrando que existe una mayor expresión de IL-2 para los individuos que recibieron el tratamiento. Esto podría deberse a la capacidad del ácido retinoico y de los antígenos clostridiales de incrementar la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R), además, de la capacidad que tiene IL-2 de incrementar otras citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular, por lo tanto, estimular de forma sinérgica su propia expresión. Realizando el análisis por grupo etario podemos encontrar que la diferencia en la expresión de IL-2 se sustenta en la diferencia encontrada en los individuos del grupo 2 (7-14 días), al parecer en los individuos del grupo 1 no se aprecia diferencia ( $p=1.0000$ ), probablemente a la incapacidad del sistema inmune de mucosas a edad temprana de realizar una diferenciación en la expresión de IL-2.

En el análisis de expresión de IL-4, no existe diferencia ( $p=0.9815$ ) entre los individuos tratados y no tratados, por lo tanto podemos concluir que la dosis administrada no ejerce un estímulo que permita una mayor expresión de IL-4. Diversos estudios han determinado la importancia que tiene IL-4 en el desarrollo de la respuesta Th2 (Stephensen *et al.*, 2002), por lo tanto en el presente estudio podría concluirse que a la dosis e individuos analizados, no se desarrolló un estímulo de la vía Th2; queda aún por definir si esta afirmación pueda ser extrapolado a otros individuos, por lo cual se sugiere ampliar los estudios a otra dosis y con mayor cantidad de individuos. Para el análisis por grupos etarios, la ausencia de diferencia ( $p=0.1371$ ) se mantiene en la expresión de IL-4, para el grupo 1; sin embargo para el grupo 2, con la prueba estadística empleada se puede encontrar diferencia a favor del grupo tratado ( $p=0.0046$ ).

Para la evaluación de la expresión de ARN mensajeros de IL-10 en los leucocitos inoculados, se encontró una expresión creciente hasta la combinación de 1 ng de antígeno clostridial y 2.5 mUI de ATRA. Se ha demostrado el efecto positivo sobre la respuesta de Th2, empleando ácido retinoico como inmunoestimulante, debido a que permite la activación de diversos genes relacionados al desarrollo Th2 como son el gen GATA-3, c-maf e IL-4R $\alpha$  (Iwata *et al.*, 2003). Por otro lado en estudios en humanos los antígenos de *Clostridium perfringens* son los más potentes estimulantes de IL-10, en comparación con otras especies del género clostridium (Tuovinen *et al.*, 2013).

Con respecto al análisis de la expresión de IL-10, se aprecia que no existe diferencia ( $p=0.3082$ ) entre tratados y no tratados. Esto podría deberse a que la dosis empleada no permitió un incremento significativo en los niveles de expresión. Diversos estudios mencionan la capacidad de el ácido retinoico (derivado de la vitamina A) como un potente regulador de la síntesis de IL-10 (Villamor y Fawzi, 2005; Zhou *et al.*, 2010), sin embargo, al parecer la dosis empleada no es la suficiente en el estudio *in vivo*. Es importante además mencionar que los niveles de expresión en los individuos del grupo tratado se encuentran más dispersos en comparación con los individuos no tratados, tanto para los individuos del grupo 1 como para el grupo 2, lo que muestra que existen valores extremos en los grupos que recibieron tratamiento, la razón de esto se mantiene en incógnita; aunque algunos autores mencionen que pueda existir un efecto dual dosis dependiente, por lo tanto, habría que corroborar si a otras dosis este efecto se mantiene; incluso existen estudios que mencionan que habiendo un incremento en la expresión de otras citoquinas de la respuesta Th2 (IL-4 e IL-5), no se observa efecto sobre la expresión de IL-10 (Dawson *et al.*, 2008). Además se ha demostrado que la respuesta frente a antígenos clostridiales permite la estimulación de IL-10, sin embargo, ésta es tardía en comparación con la respuesta de las citoquinas de la respuesta celular (Tuovinen *et al.*, 2013); debido a esto podría deberse la falta de detección de la respuesta de IL-10 en nuestro estudio, probablemente la respuesta se evidencie en un tiempo posterior, motivo por el cual se recomienda ampliar el tiempo de muestreo post – tratamiento.

Es importante mencionar, que de acuerdo al grado de dispersión de los valores para cada grupo evaluado, podemos observar una mayor dispersión para los grupos que recibieron el tratamiento, es decir, podemos encontrar individuos que presenten niveles extremos, como elevados con respecto a la mediana (cuartil 50) así como valores bajos con respecto al mismo. Esto nos muestra que al parecer la respuesta al tratamiento varía mucho entre individuos, y que ésta estaría relacionada a diferentes factores involucrados al momento de la administración del mismo; como el tipo de alimento, composición de la flora intestinal, estado nutricional, etc.

Las diferentes especies mamíferas nacen con un pobre desarrollo del sistema inmunológico, y esto se evidencia claramente en el desarrollo inmunológico intestinal,

el cual continúa en la vida postnatal. Si bien puede existir una normal a elevada tasa de linfocitos T CD4/CD8, se ha demostrado que tienen niveles bajos de linfocitos T citotóxicos y NK, explicando el porqué los neonatos tienen una pobre respuesta celular; aunque ésta, además, estaría relacionado al tipo de antígeno involucrado (Yu *et al*, 2003). Los resultados del presente estudio permiten establecer que el tratamiento empleado en los individuos tratados ejerció un efecto estimulante sobre la respuesta Th1, a través del incremento en la expresión de las principales citoquinas que median la vía de respuesta celular; sin embargo, no se detectó un efecto estimulante en las citoquinas de respuesta humoral; de acuerdo a esto, podemos afirmar que la combinación empleada, fue un fuerte estimulante de la vía Th1, pero no así de la respuesta Th2 (al menos no detectado), en los individuos analizados. Estudios recientes revelan que claramente existe un efecto estimulante del ácido retinoico sobre la respuesta inmune citotóxica, a través del incremento en la expresión de IL-2 y la proliferación de linfocitos T (Mora *et al*, 2010; Hall *et al*, 2011). Otra de las causas podría ser la capacidad del ácido retinoico de incrementar los receptores homing de linfocitos en el tejido linfoide asociado a mucosas y en macrófagos del tracto intestinal (Kim, 2008); además de la habilidad del sistema inmune de facilitar la respuesta de una de las vías, frente a un estímulo determinado; pero inhibir su contraparte (Mikhak *et al*, 2006; Yagi *et al*, 2011). Es más, frente a diferentes infecciones bacteriales, se origina inicialmente una respuesta de tipo Th1, en la etapa inicial de la infección, y posteriormente se produce un switching a una respuesta Th2, por ejemplo, en infecciones por *E.coli*, se ha demostrado que esta respuesta surge después del séptimo día de infección (Chopra *et al*, 1997; Spellberg y Edwards, 2001). Por otro lado, frente a un tipo de estímulo existe una activación de diferentes factores transcripcionales, agrupados en aquellos que permiten la activación de la vía Th1 o Th2. Así T-bet surge como el principal miembro de la familia de activadores transcripcionales de la respuesta Th1; y GATA-3 como el factor transcripcional mas importante de la vía Th2; y que diversos estudios han demostrado que frente a una activación de T-bet (vía Th1); existe un bloqueo o supresión de GATA-3 (Hwang *et al*, 2005; Powell *et al*, 2010).

La ausencia de la evaluación de la expresión de las interleucina IL-5 y el Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en el trabajo, no nos permite evaluar el posible estímulo del inmunógeno sobre la producción de la IgA en la mucosa intestinal, ya que

estas dos citoquinas son las principales reguladores que dirigen la expresión de IgA en los linfocitos B estimulados (Borsutzky *et al*, 2004). Sin embargo en un estudio paralelo para determinar la expresión de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas, se observa un incremento significativo en los animales estimulados con el mismo inmunógeno.

## VI. CONCLUSIONES

- En ensayos *in vitro*, el empleo de la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales, a diferentes concentraciones, incrementaron las expresiones de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2 e IL-10.
- En ensayos *in vivo*, la administración de la doble dosis de la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales (0.067UI/Kg de ácido retinoico y 12.89mg de antígeno clostridial) incrementaron las expresiones de TNF-alfa, IL-2 e IFN gamma.
- En ensayos *in vivo*, la administración de la doble dosis de la combinación de ácido retinoico y antígenos clostridiales (0.067UI/Kg de ácido retinoico y 12.89mg de antígeno clostridial) no incrementaron las expresiones de IL-4 e IL-10.

## VII. LITERATURA CITADA

1. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124: 783-801.
2. **Ameghino E., DeMartini J.** 1991. Mortalidad en Crías de Alpacas. Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Lima – Perú. p. 128.
3. **Baraibar J.** 2006. Algunos conceptos sobre vacunas bacterianas y virales. *Veterinaria* 41 (163-164): 35 - 52.
4. **Belyakov I, Ahlers J.** 2009. What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens?. *J. Immunol.* 183: 6883-6892.
5. **Berin M, Yang P, Ciok L, Wasserman S, Perdue M.** Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 276: C1046-C1052.
6. **Bokaya P, Marinaro M, Jackson R, Menon S, Kiyono H, Jirillo E, McGhee J.** 1999. *J. Immunol.* 162: 122-128.
7. **Borsutzky S, Cazac B, Roes J, Guzmán C.** 2004. TGF- $\beta$  receptor signaling is critical for mucosal immune IgA responses. *J. immunol.* 173: 3305-3309.
8. **Brown T.** 1996. Immunity at Mucosal Surfaces. *Adv Dent Res* 10(1): 62-65.
9. **Burmester G., Pezzutto A.** 2003. *Color Atlas of Immunology.* George Thieme Verlag. Stuttgart – Germany. p. 322.



10. **Carter L. y Murphy K.** 1999. Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (STAT) 4 in Interferon  $\gamma$  production from CD4+ versus CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 189(8): 1355-1360.
11. **Catharine R.** 1992. Vitamin A status: Relationship to immunity and the antibody response. *Poc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 303-320.
12. **Chen X, Esplin B, Garrett K, Welner R, Webb C, Kincade P.** 2008. Retinoids accelerate B lineage Lymphoid Differentiation. *J. immunol.* 180: 138-145.
13. **Chiok K.** 2012. Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis de Magister. Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
14. **Chopra U, Vohra H, Chibber S.** 1997. Th1 pattern of cytokine secretion by splenic cells from pyelonephritic mice after in vitro-stimulation with hsp-65 of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 46: 139-144.
15. **Coombes J, Siddiqui K, Arancibia-Cárcamo C, Hall J, Sun C, Belkaid Y, Powrie F.** 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204(8): 1757-1764.
16. **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.
17. **Dawson H, Collins G, Pyle R, Key M, Taub D.** 2008. The Retinoic Acid Receptor- $\alpha$  mediates Human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production. *BMC Immunology.* 9 (16): 1-14.
18. **DeCicco K, Zolfaghari R, Li N, Ross C.** 2000. Retinoic Acid and Polyriboinosinic Acid Act Synergistically to Enhance the Antibody Response to Tetanus Toxoid during Vitamin A Deficiency: Possible involvement of Interleukin-2 Receptor- $\beta$ , Signal Transducer and Activator of Transcription-1, and Interferon Regulatory Factor-1. *J. Infec. Dis.* 182(1): S29-S36.
19. **Devaux Y, Grosjean S, Seguin C, David C, Dousset B, Zannad F, Meistelman C, De Talancé N, Mertes P, Ungureanu-Longrois D.** 2000. Retinoic acid and host-pathogen interactions: effects on inducible nitric oxide synthase in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E1045-E1053.

20. **Dzhagalov I, Chambon P, He You-Wen.** 2007. Regulation of CD8+ T Lymphocyte effector function and Macrophage Inflammatory Cytokine Production by Retinoic Acid Receptor  $\gamma$ . *J. Immunol.* 178: 2113-2121.
21. **Ellias K, Laurence A, Davidson T, Stephens G, Kanno Y, Shevach E, O'Shea J.** 2008. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances Foxp3 expression through a STAT-3/STAT-5 independent signaling pathway. *111: 1013-1020.*
22. **Ellis R.** 2006. *Clostridium perfringens enteritis: The complete alpaca book.* p. 464-467. Ed. Hoffman 2da. Ed. California.
23. **Engedal N, Ertesvag A, Blomhoff H.** 2004. Survival of activated Human T lymphocytes is promoted by retinoic acid via induction of IL-2. *Int. Immunol.* 16(3): 443-453.
24. **Engedal N, Gjevik T, Blomhoff R, Blomhoff H.** 2006. All-trans Retinoic acid stimulates IL-2 mediated Proliferation of human T Lymphocytes: Early induction of Cyclin D3. *J. immunol.* 177: 2851-2861.
25. **Ertesvag A, Engedal N, Naderi S, Blomhoff H.** 2002. Retinoic Acid stimulates the Cycle Cell Machinery in Normal T cell: Involvement of Retinoic Acid Receptor-Mediated IL-2 Secretion. *J. Immunol.* 169: 5555-5563.
26. **Favre L, Spertini F, Corthésy B.** 2005. Secretory IgA possesses Intrinsic Modulatory Properties Stimulating Mucosal and Systemic Immune Responses. *The Journal of Immunology.* 175: 2793-2800.
27. **Fowler M.** 1998. *Medicine and surgery of South American camelids.* 2da. ed. p. 160-169. Iowa State University Press. Iowa.
28. **Goldsby R, Kindt T, Kuby J, Osborne B.** *Immunology Fifth Edition.*
29. **Gorjao R, Massao S, Martins T, Cury-Boaventura M, Curi R.** 2007. Regulation of Interleukin-2 signaling by fatty acids in human lymphocytes. *J. Lipid. Res.* 48: 2009-2019.
30. **Hall J, Grainger J, Spencer S, Belkaid Y.** 2011. The Role of Retinoic Acid in Tolerance and Immunity. *Immunity.* 35(1): 13-22.
31. **Heffernan J, Keeling M.** 2009. Implications of vaccination and waning immunity. *Proc. R. Soc. B.* 276: 2071-2080.
32. **Hoag K, Nashold F, Goverman J, Hayes C.** 2002. Retinoic Acid Enhances the T helper 2 cell Development that is Essential for Robust Antibody Responses through its action on antigen-presenting cells. *J. Nutr.* 132: 3736-3739.

33. **Hoft D, Eickhoff C.** 2005. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect. Immun.* 73(8): 4934-4940.
34. **Housley W, O'Connor C, Nichols F, Puddington L, Lingenheld E, Zhu L, Clark R.** 2009. PPAR $\gamma$  regulates retinoic acid-mediated DC induction of T reg. *J. Leukoc. Biol.* 86: 293-301.
35. **Hwang E, Szabo S, Schwartzberg P, Glimcher L.** 2005. T Helper Cell Fate Specified by Kinase Mediated Interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 307: 430-433.
36. **Iwata M, Eshima Y, Kagechika H.** 2003. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int. Immunol.* 15(8): 1017-1025.
37. **Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M.** 2003. *Immunobiology: The immune system in health and disease.* Garland Publishing. 5<sup>th</sup> Edition. 910p.
38. **Jobin C, Sartor B.** 2000. The I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278: C451-C462.
39. **Kaiserlian D, Cerf-Bensussan N, Hosmalin A.** 2005. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *J. Leukoc. Biol.* 78: 311-318.
40. **Kamysz W, Okrój M, Lukasiak J.** 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Bioquímica Polonica.* 50: 461-469.
41. **Kim C.** 2008. Roles of Retinoic Acid in Induction of Immunity and Immune Tolerance. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders – Drugs Targets.* 8: 289-294.
42. **Leach M, Davidson N, Fort M, Powre F, Rennik D.** 1999. The role of IL-10 in Inflammatory Bowel Disease: "Of Mice and Men". *Toxicol. Pathol.* 27: 123-133.
43. **Liu Z, Lefrançois L.** 2004. Intestinal Epithelial Antigen Induces Mucosal CD8 T cell Tolerance, Activation and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology.* 173: 4324-4330.
44. **Loughlin E, Pang G, Noltorp L, Koina C, Batey R, Clancy R.** 2001. Interleukin 2 modulates ion secretion and cell proliferation in cultured human small intestinal enterocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C1367-C1374.

45. **Luo X. y Ross C. 2006.** Retinoic Acid exert Dual Regulatory Actions on the Expression and Nuclear Localization of Interferon Regulatory Factor-1. *Exp. Biol. Med.* 231: 619-631.
46. **Ma Y, Chen Q, Ross C. 2005.** Retinoic Acid Polyribonucleosinic: Polyribocytidylic Acid Stimulate Robust Anti-tetanus Antibody Production while Differentially Regulating Type 1/Type 2 Cytokines and Lymphocytes Populations. *J. Immunol.* 174: 7961-7969.
47. **Matheu V, Barrios Y. 2004.** Influencia de la IL-10 en la enfermedad alérgica múltiple. *Alergol. Inmunol. Clin.* 19: 61-64.
48. **Mayer L. 2003.** Mucosal Immunity. *Pediatrics.* 111: 1595-1600.
49. **Maynard C, Hatton R, Helms W, Oliver J, Stephensen C, Weaver C. 2009.** Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF- $\beta$  – mediated induction of Foxp3 and il10 genes in developing regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206: 343-357.
50. **McDonel. 1986.** Toxins of *C. perfringens* types A, B, C, D and E. *Pharmacology of Bacterial Toxins.* Pergman Press, Oxford. P. 477-517.
51. **McElduff F, Cortina-Borja M, Chan S, Wade A. 2010.** When t-test or Wilcoxon-Mann-Whitney tests won't do. *Adv. Physiol. Educ.* 34: 128-133.
52. **Mead J, Hughes T, Irvine S, Singh N, Ramji D. 2003.** Interferon- $\gamma$  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.
53. **Meador B, Krzyszton C, Johnson R, Huey K. 2008.** Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult. *J. Appl. Physiol.* 104: 991-997.
54. **Mehta K, McQueen T, Tucker S, Pandita R, Aggarwal B. 1994.** Inhibition of all-trans retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55: 336-342.
55. **Mestecky J, Rusell M, Elson C. 2007.** Perspectives on mucosal vaccines: Is mucosal tolerance a barrier?. *J. Immunol.* 179: 5633-5638.
56. **Mikhak Z, Fleming C, Medoff B, Thomas S, Tager A, Campanella G, Luster A. 2006.** STAT1 in Peripheral Tissue Differentially Regulates Homing of Antigen-Specific Th1 and Th2 Cells. *J. Immunol.* 176: 4959-4967.

57. **Mora J, Iwata M, von Adrián U.** 2008. Vitamin Effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* 8(9): 685-698.
58. **Morris J, Waldmman T.** 2000. Advances in Interlekin-2 receptor targeted treatment. *Ann Rheum Dis.* 59(1): i109-i114.
59. **Ogra P, Faden H, Welliver R.** 2001. Vaccination strategies for mucosal Immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 430-445.
60. **Oppenheim J, Biragyn A, Kwak L, Yang D.** 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 62: 17-21.
61. **Ott D, Lachance P.** 1979. Retinoic acid - a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2522-2531.
62. **Pabst O, Bernhardt G, Förster R.** 2007. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J. Leukoc. Biol.* 82: 795-800.
63. **Pamer E.** 2007. Immune responses to comensal and environmental microbes. *Nat. Immunol.* 8(11): 1173-1178.
64. **Perdue M.** 1999. Mucosal Immunity and Inflammation III. The mucosal antigen barrier: cross-talk with mucosal cytokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 277: G1-G5.
65. **Pérez D.** 2006. Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. p91.
66. **Phadke S, Deslouches B, Hileman S, Montelaro R, Wiesenfeld H, Mietzner T.** 2005. Antimicrobial peptides in Mucosal Secretions: The Importance of Local Secretions in Mitigating Infection. *J. Nutr.* 135: 1289-1293.
67. **Podolski D.** 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277: 495-499.
68. **Powell N, Canavan J, MacDonald T, Lord G.** 2010. Transcriptional regulation of the mucosal immune system mediated by T-bet. *Nature Immunology.* 3(6): 567-577.
69. **Prehn N, Saez S, Arraigada M.** 1999. Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* en camélidos sudamericanos. Res. II Cong. Mun. Sobre Camelidos. Cusco, Perú. p. 140.

70. **Ramírez A.** 1987. Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin. In partial fulfillment of requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Colorado State University, Colorado. 201p.
71. **Roca V.** 2011. Caracterización histológica y dinámica linfóide de las placas de peyer en crías de alpacas durante los primeros 45 días de vida. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 78p.
72. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Llanco L, Castillo H, Véliz A, Yaya K, Londoño P.** 2008. Enterotoxemia: New Evidence on Pathogenesis and Prevention of the Number One Cause of Neonatal Alpaca Mortality in South America. Australian Alpaca Association Ltd. World Alpaca Conference.
73. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L.** 2012. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. Rev. Inv. Vet. Perú. 23(3): 261-271.
74. **Sanhong Y, Mingcan X, Xu W, Chu Y, Wang Y, Xiong S.** 2005. All-trans retinoic acid biases immune response induced by DNA vaccine in a Th2 direction. Vaccine. 23(44): 5160-5167.
75. **Sarkar J, Gangopadhyay N, Moldoveanu Z, Mestecky J, Stephensen C.** 1998. Vitamin A is required for regulation of Polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) Expression by Interleukin-4 and Interferon- $\gamma$  in a Human Epithelial Cell Line. J. Nutr. 128: 1063-1069.
76. **Schmittgen T, Livak K.** 2008. Analyzing real-time PCR data by comparative Ct method. Nature Protocols. 3(6): 1101-1108.
77. **Schroder K, Hertzog P, Ravasi T, Hume D.** 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanism and functions. J. Leukoc. Biol. 75: 163-189.
78. **Schultz M, Tonkonogy S, Sellon R, Veltkamp C, Godfrey V, Kwon J, Grenther W, Balish E, Horak I, Balfour Sartor R.** 1999. IL-2 deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 276: G1461-G1472.
79. **Shanahan F.** 2000. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 278: G191-196.
80. **Spellberg B, Edwards J.** 2001. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. Infectious Diseases Society of America. 32: 76-102.

81. **Spilianakis C, Ryol Lee G, Flavell L.** 2005. Twisting the Th1/Th2 immune response via Retinoic X Receptor: Lessons from a genetic approach. *Eur. J. Immunol.* 35: 3400-3404.
82. **Staros E.** 2005. New Approaches to Understanding Its Clinical Significance. *Am. J. Clin. Pathol.* 123: 305-312.
83. **Stephensen C, Rasooly R, Jiang X, Ceddia M, Weaver C, Chandraratna R, Bucy P.** 2002. Vitamin A Enhances in Vitro Th2 Development Via Retinoids X Receptor Pathways. *J. Immunol.* 168: 4495-4503.
84. **Sun C, Hall J, Blank R, Bouladoux N, Oukka M, Mora J, Belkaid Y.** 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3+ T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204(8): 1775-1785.
85. **Tan X, Sande J, Pufnock J, Blattman J, Greenberg P.** 2011. Retinoic Acid as a Vaccine Adjuvant Enhances CD8+ T cell Response and Mucosal Protection from Viral Challenge. *J. Virol.* 85(16): 8316-8327.
86. **Tau G, von der Weid T, Lu B, Cowan S, Kvatyuk M, Pernis A, Cattoretti G, Braunstein N, Coffman R, Rothman P.** 2000. Interferon  $\gamma$  Signaling Alter the Function of T Helper Type 1 cells. *J. Exp. Med.* 192(7): 977-986.
87. **Tobler A, Munker R, Heitjan D, Koeffler HP.** 1987. In vivo interaction of recombinant tumoral necrosis factor alpha and all-trans retinoic acid with normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood.* 70(6): 1940-1946.
88. **Tuovinen E, keto J, Nikkila J, Matto J, Lahteenmaki K.** 2013. Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species. *Anaerobe.* 19: 70 – 76.
89. **Villamor E, Fawzi W.** 2005. Effects of Vitamin A Supplementation on Immune Responses and Correlation with Clinical Outcomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(3): 446-464.
90. **Wakil A, Wang Z, Ryan J, Fowell D, Locksley R.** 1998. Interferon  $\gamma$  derived from CD4+ T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. *J. Exp. Med.* 188(9): 1651-1656.
91. **Wallace F, Mach A, Keller A, Lindsay J.** 1999. Evidence for *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) Inducing a Mitogenic and Cytokine Response In Vivo and a Cytokine Response In Vivo. *Current Microbiology.* 38: 96 – 100.

92. **Wang C, Kang S, HogenEsch H, Love P, Kim C.** 2008. Retinoic Acid Determines the precise tissue tropism of inflammatory Th17 cells in the intestine. *J. Immunol.* 184: 5519-5526.
93. **Wang J, Wu S, Jin X, Li M, Chen S, Teeling J, Hugh Perry V, Gu J.** 2008. Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Mediated Late Phase Induction of TNF-alpha by Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 180: 8011-8019.
94. **Weigmann B, Neurath M.** 2002. T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. *Gut.* 51: 301-303.
95. **Whitcher M, Ross D, Rousseau C, DeLuca L, Miller W.** 2003. Synergy between all-trans retinoic acid and tumoral necrosis factor pathways in acute leukemia cells. *Blood.* 102(1): 237-245.
96. **Xiao S, Jin H, Korn T, Liu S, Oukka M, Lim B, Kuchroo V.** 2008. Retinoic Acid increases Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- $\beta$  driven smad 3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol.* 181: 2277-2284.
97. **Xin J, Ohmori K, Nishida J, Zhu Y, Huang H.** 2007. The initial response of CD4<sup>+</sup> IL-4 producing cells. *International Immunology.* 19(3): 305-310.
98. **Yagi R, Suzuki W, Seki N, Kohyama M, Inoue T, Arai T, Kubo M.** 2002. The IL-4 production capability of different strains of naïve CD4<sup>+</sup>T cells controls the direction of the Th cells response. *International Immunology.* 14(1): 1-11.
99. **Yagi R, Zhu J, Paul W.** 2011. An update view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International Immunology.* 23(7); 415-420.
100. **Yaya K, Rosadio R.** 2005. Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev Inv Vet Perú.* 16 (1):49-55.
101. **Yu H, Chang J, Chen R, Chuang H, Hong K, Wang L, Yang K.** 2003. Different antigens trigger different Th1/Th2 reactions in neonatal mononuclear cells (MNCs) relating to T-bet/GATA-3 expression. *J. Leukoc. Biol.* 74: 952-958.
102. **Yuan Q, Walker W.** 2004. Innate Immunity of the Gut: Mucosal Defense in Health and Disease. *JPGN.* 38: 463-473.
103. **Zhou X, Kong N, Wang J, Fan H, Zou H, Horwitz D, Brand D, Liu Z, Zheng S.** 2010. Cutting Edge: All-trans Retinoic Acid Sustains the Stability and Function



of Natural Regulatory T Cells in an Inflammatory Milieu. *J. Immunol.* 185: 2675 – 2679.

## **VII.APÉNDICE**

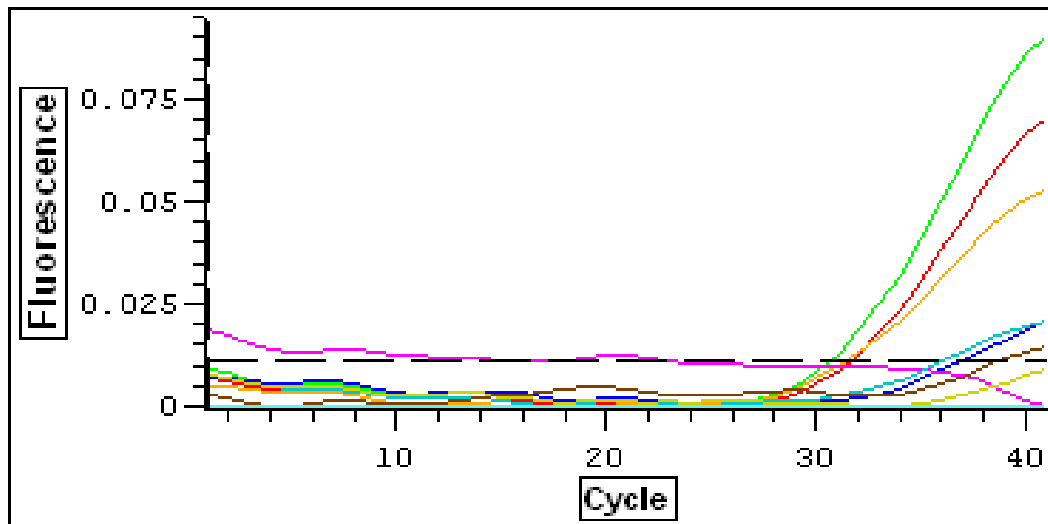


Figura A1. Curva de amplificación de los productos de ARN mensajeros del gen GAPDH, obtenidos de los leucocitos tratados.

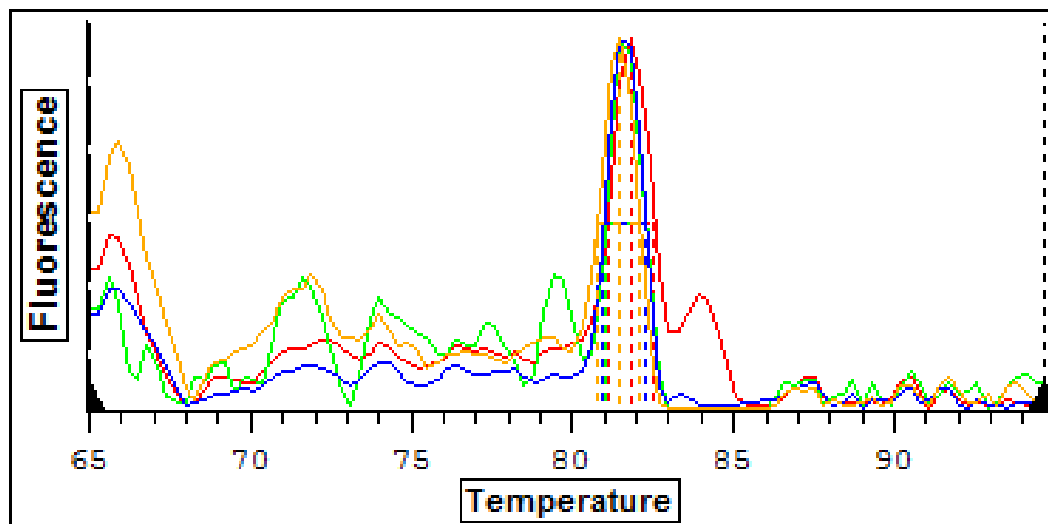


Figura A2. Temperatura de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen GAPDH, obtenidos de los leucocitos tratados.

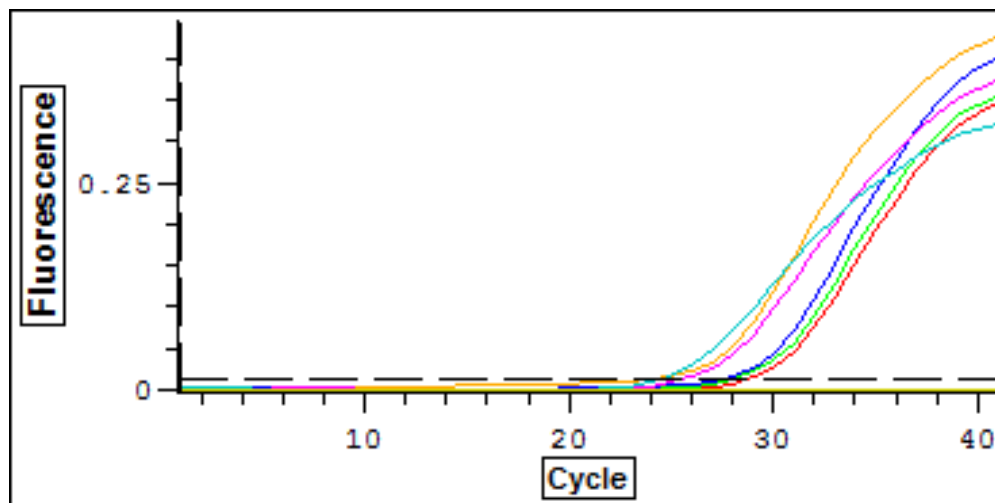


Figura A3. Curva de amplificación de de los productos de ARN mensajeros de TNF- $\alpha$ , obtenidos de los leucocitos tratados.

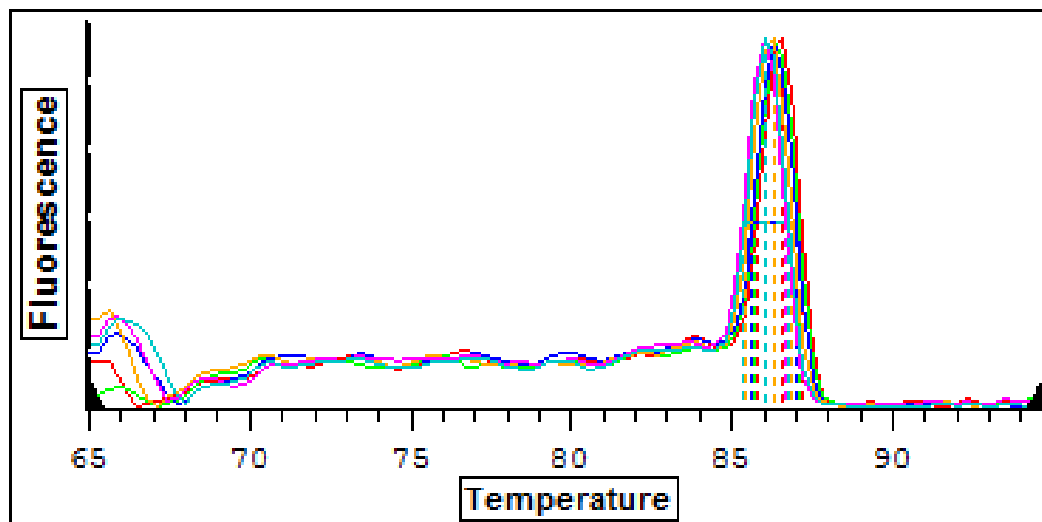


Figura A4. Temperatura de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen TNF- $\alpha$ , obtenidos de los leucocitos tratados.

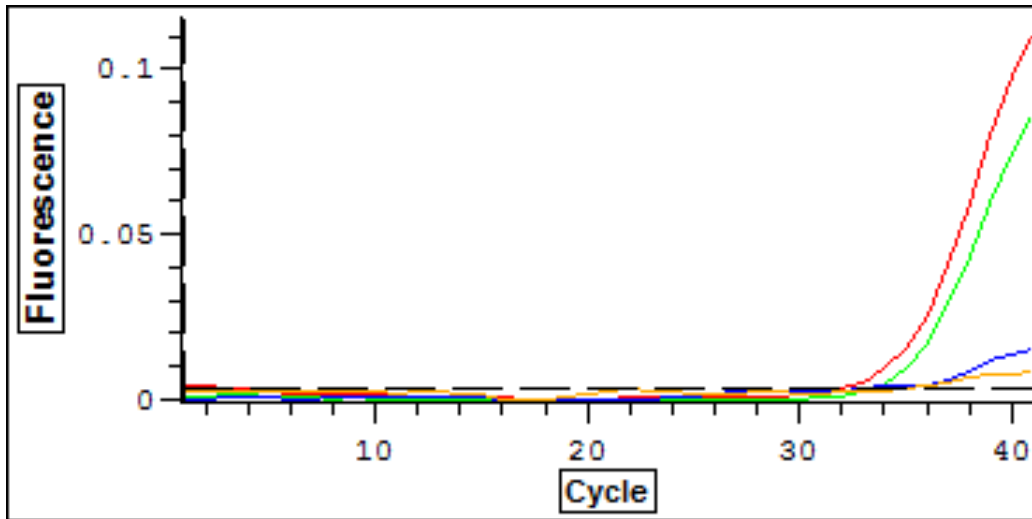


Figura A5. Curvas de amplificación de los productos de ARN mensajeros de IFN- $\gamma$ , obtenidos de los leucocitos tratados.

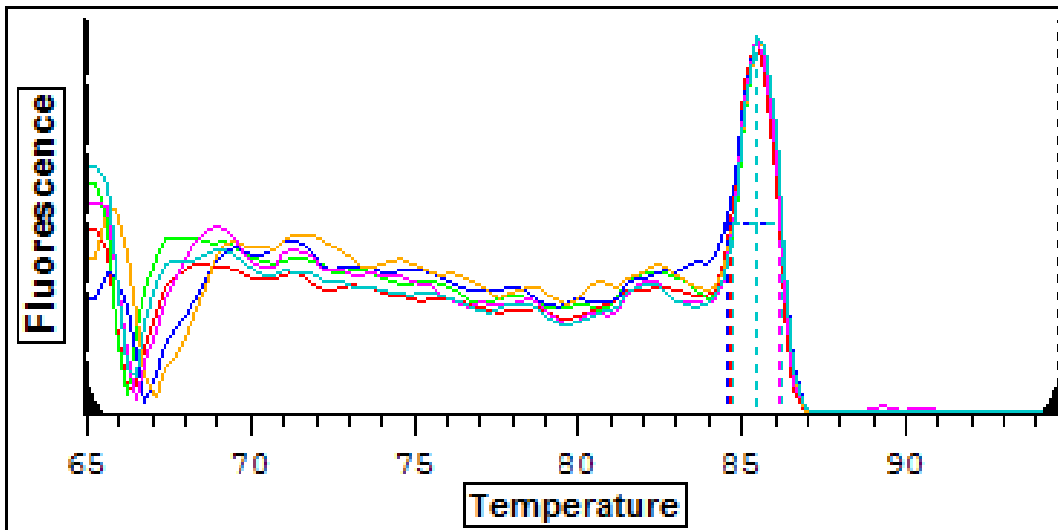


Figura A6. Temperatura de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen IFN- $\gamma$ , obtenidos de los leucocitos tratados.

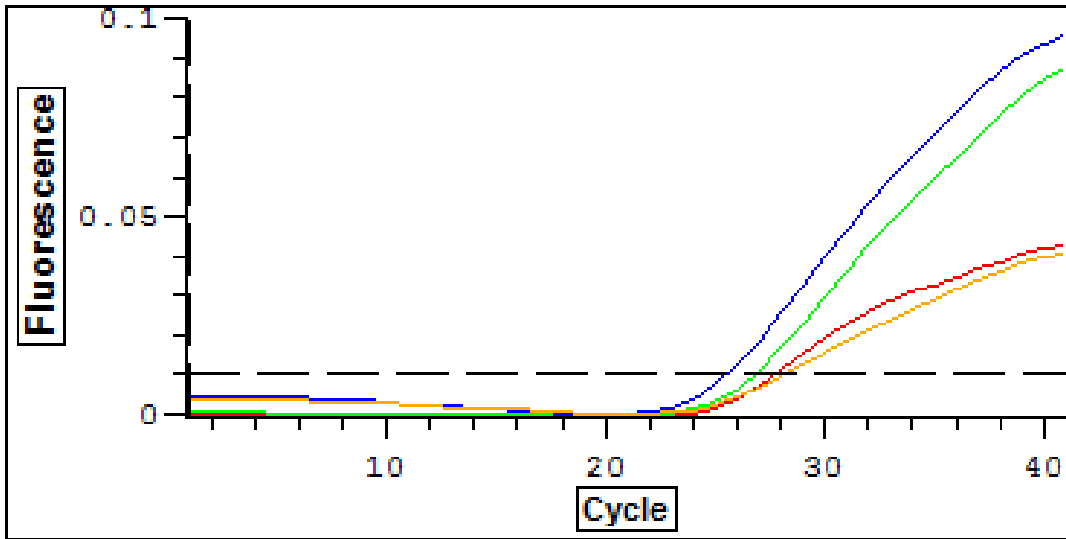


Figura A7. Curvas de amplificación de los productos de ARN mensajeros de IL-2, obtenidos de los leucocitos tratados.

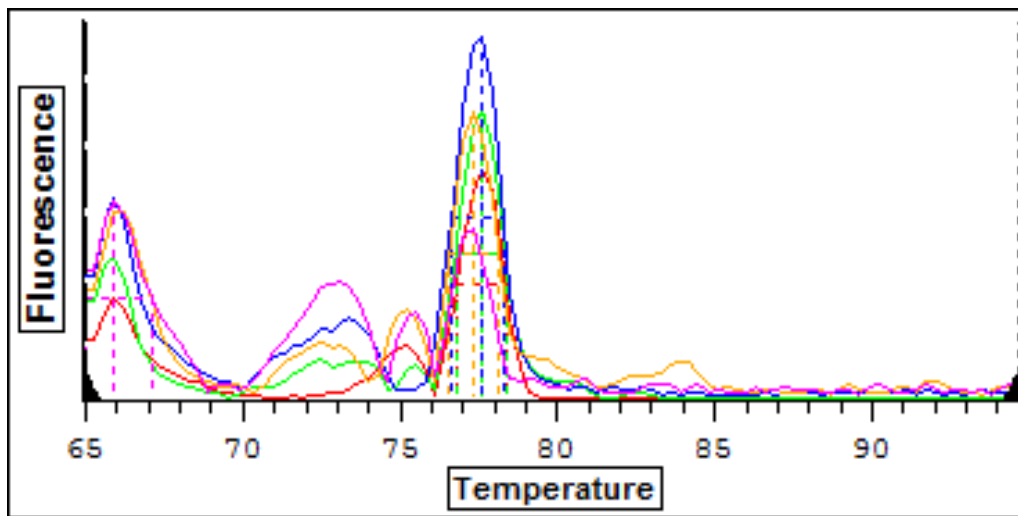


Figura A8. Temperaturas de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen IL-2, obtenidos de los leucocitos tratados.

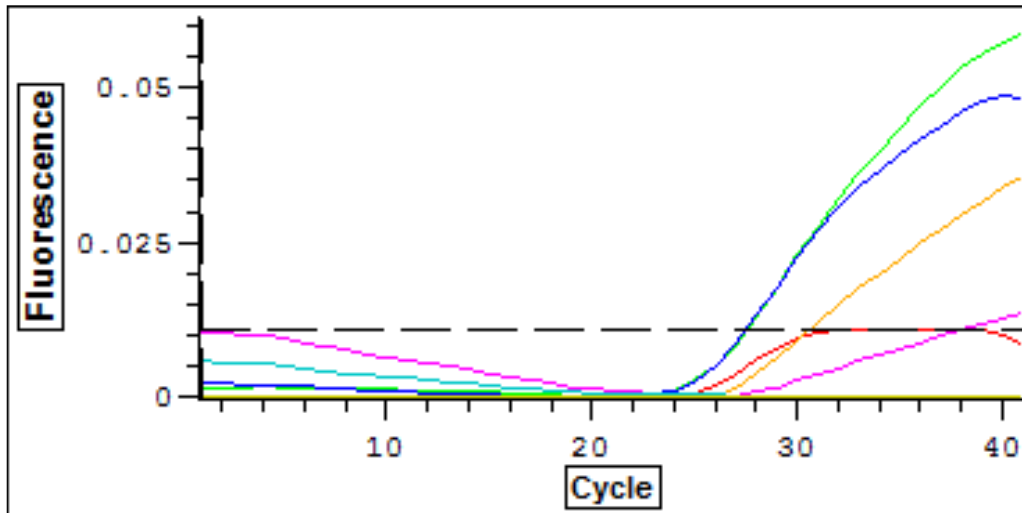


Figura A9. Curvas de amplificación de los productos de ARN mensajeros de IL-10, obtenidos de los leucocitos tratados.

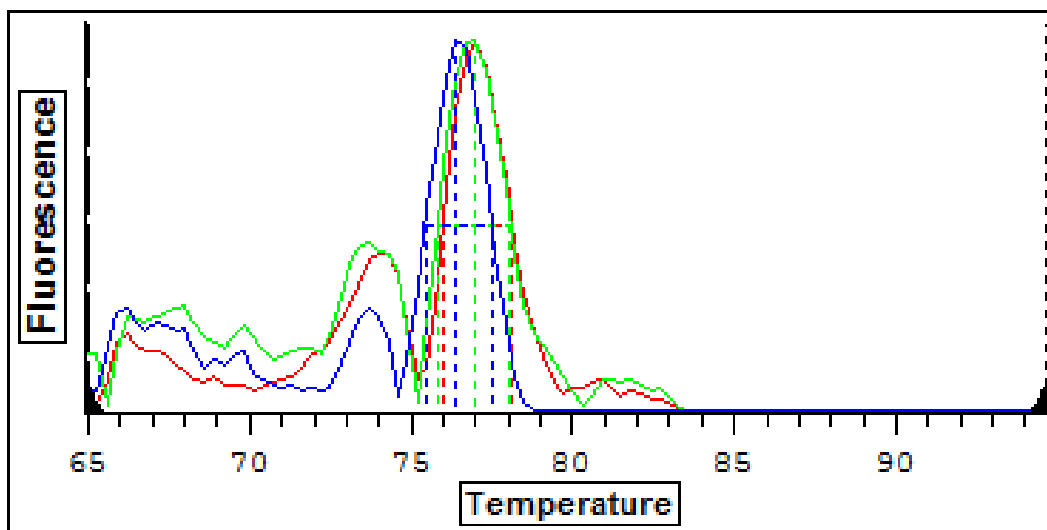


Figura A10. Temperaturas de disociación de los productos amplificados de ARN mensajeros del gen IL-10; obtenidos de los leucocitos tratados.

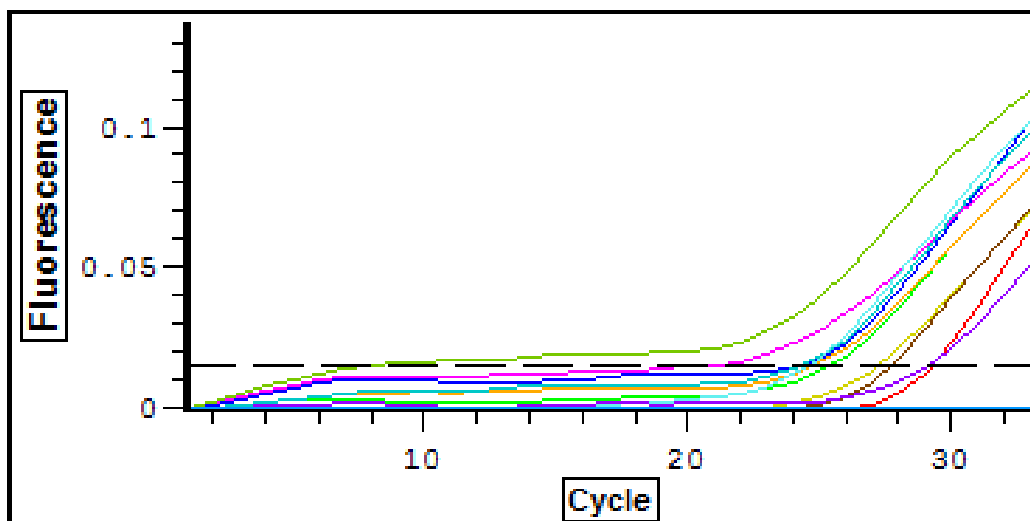


Figura A11. Curva de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para el gen GAPDH en las muestras de los individuos tratados y no tratados.

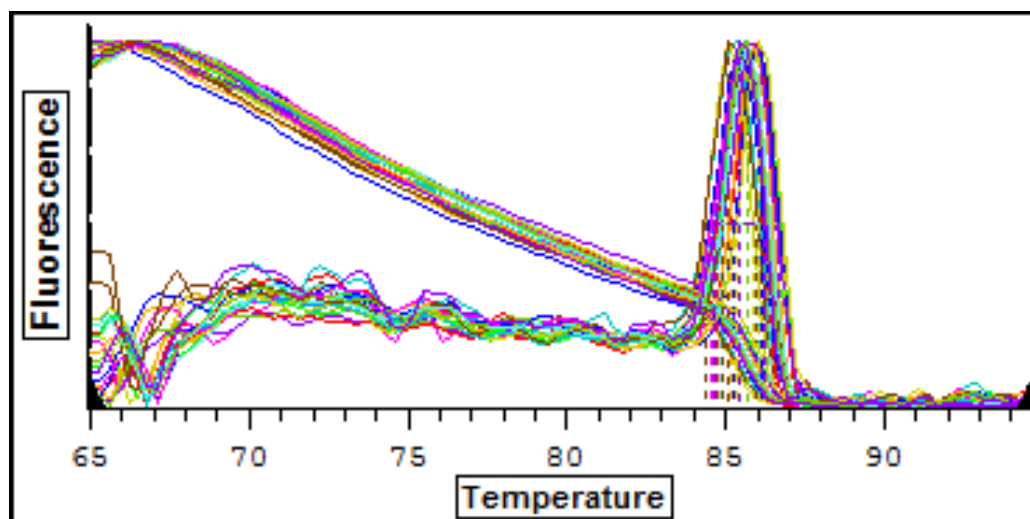


Figura A12. Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para el gen GAPDH en las muestras de los individuos tratados y no tratados.



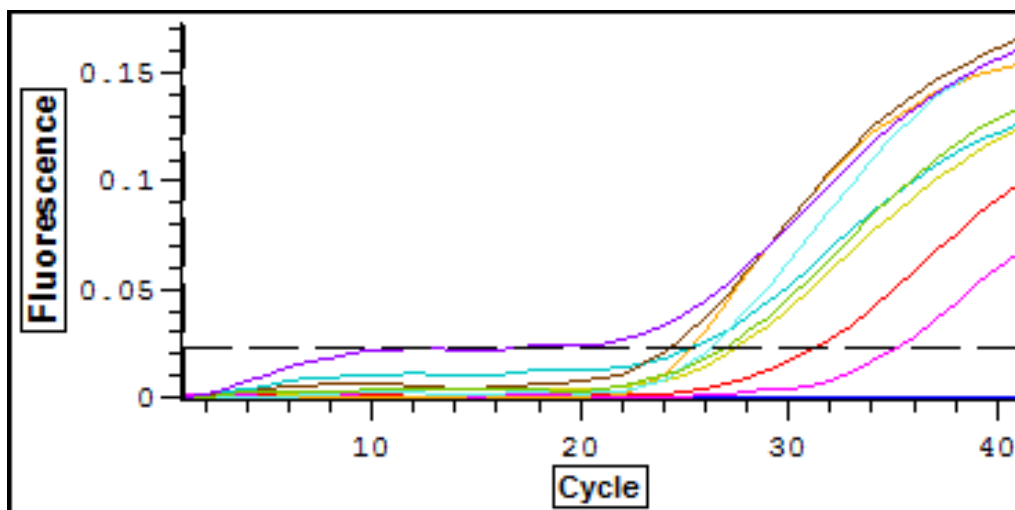


Figura A13. Curva de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IFN- $\gamma$ .

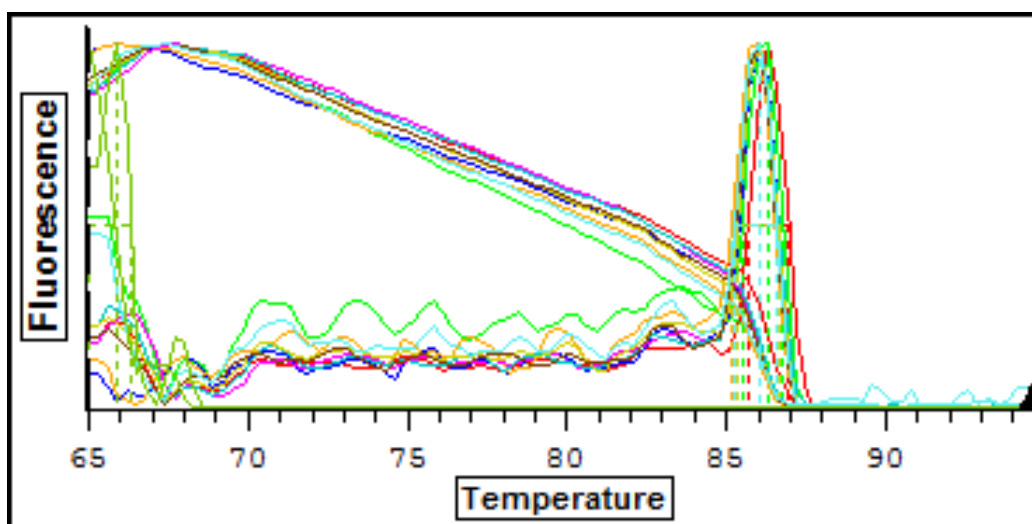


Figura A14. Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para determinación de la expresión de IFN- $\gamma$ .

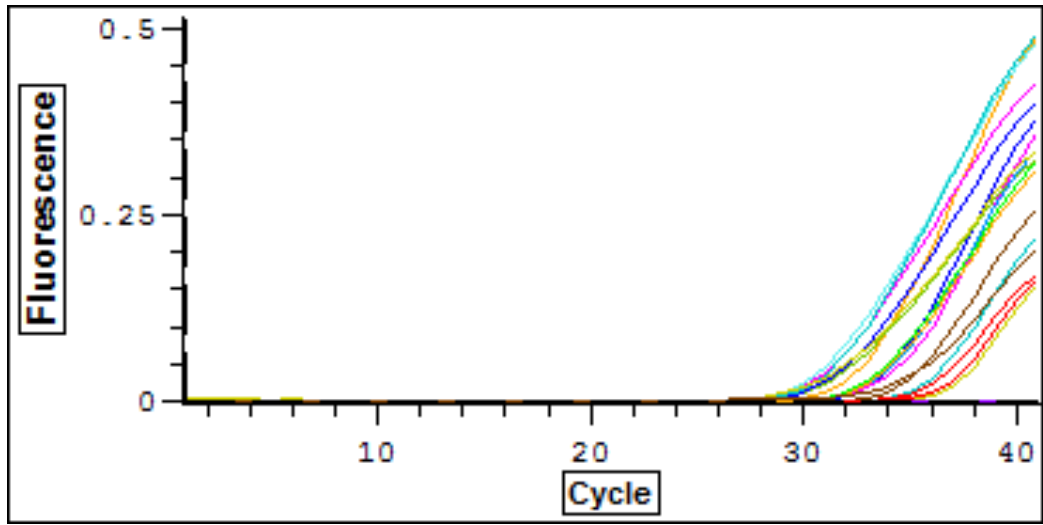


Figura A15. Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de TNF- $\alpha$ .

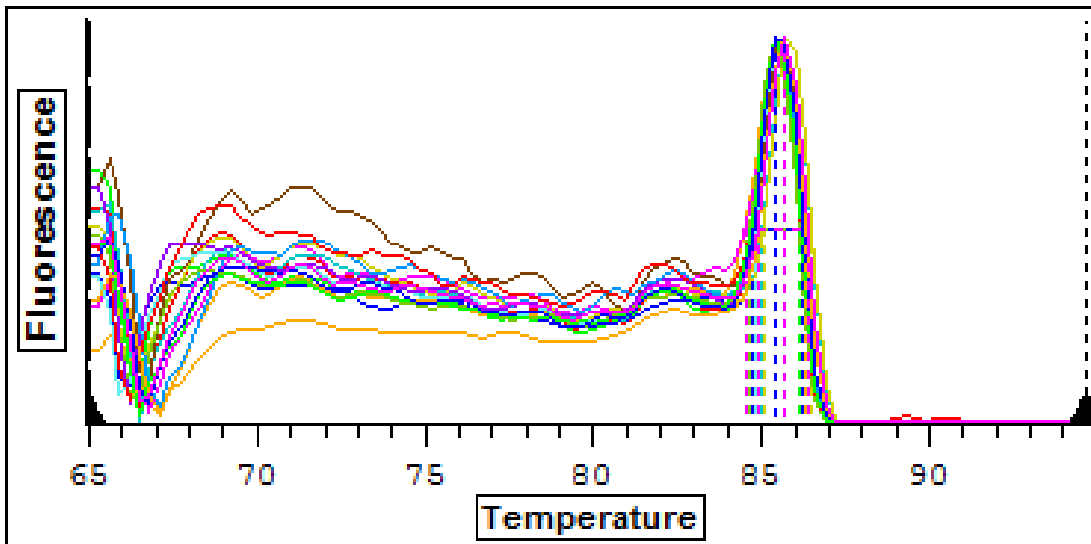


Figura A16. Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para la determinación de la expresión de TNF- $\alpha$ .

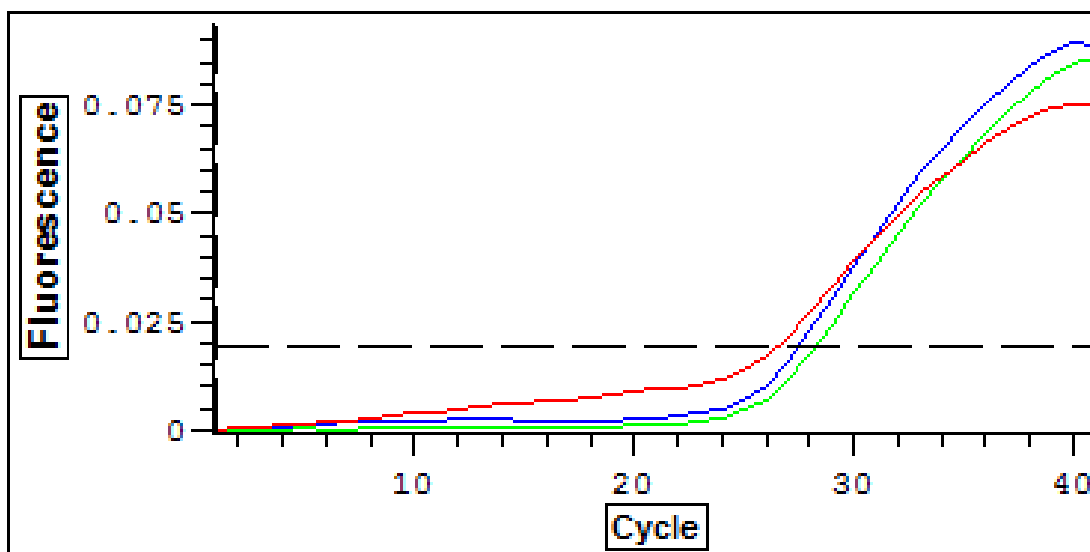


Figura A17. Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IL-2

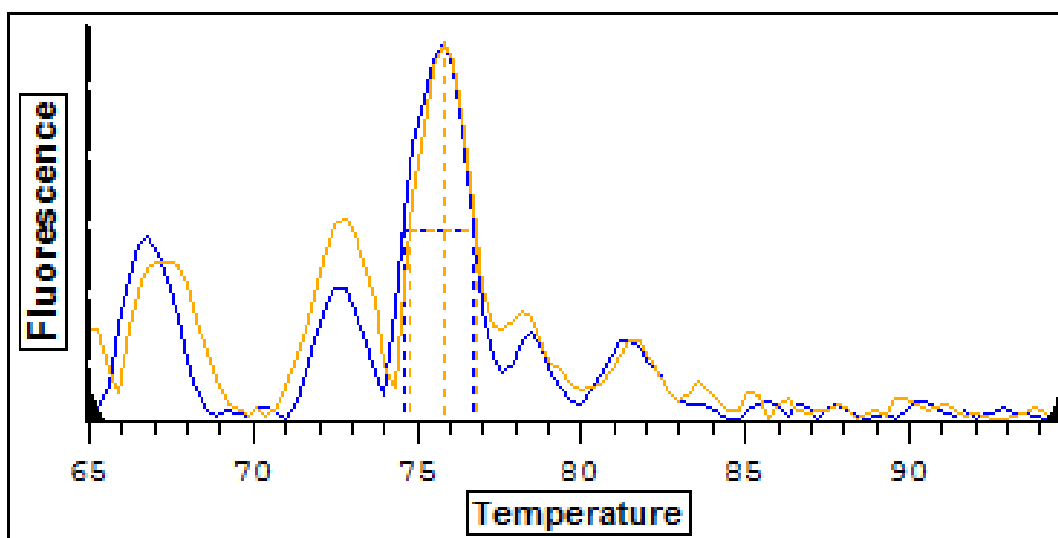


Figura A18. Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para la determinación de la expresión de IL-2.

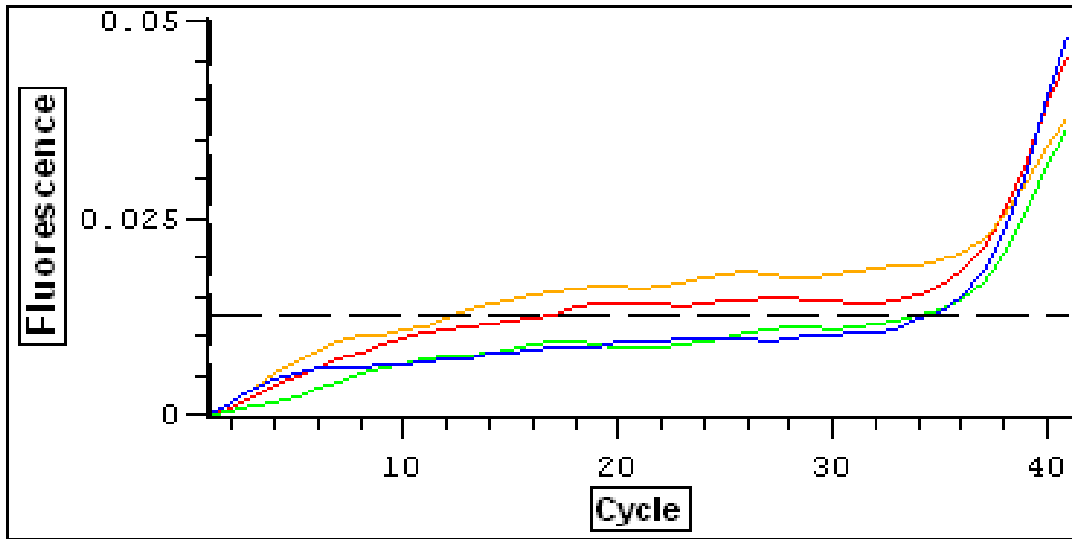


Figura A19. Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IL-4.

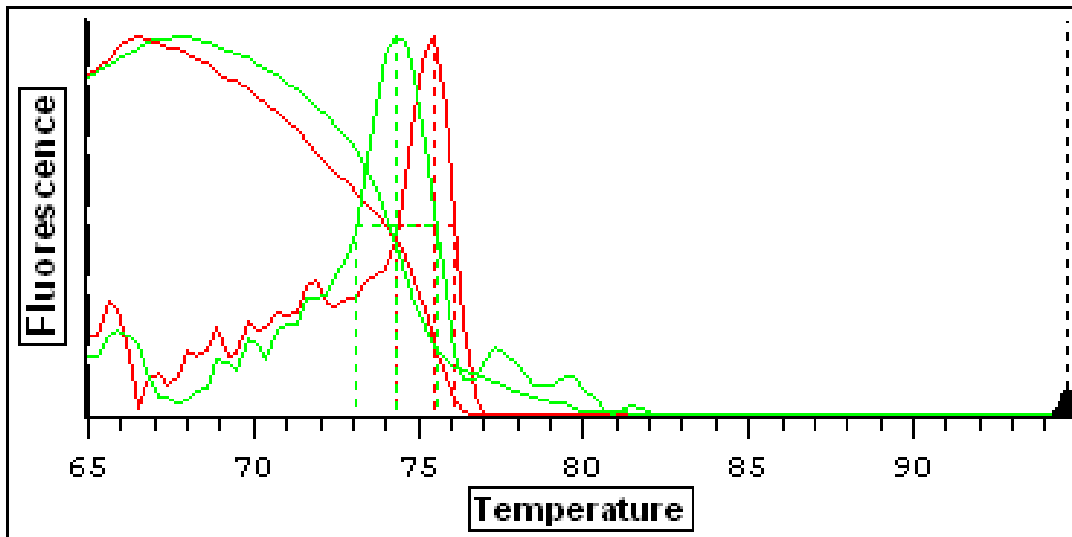


Figura A20. Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IL-4.

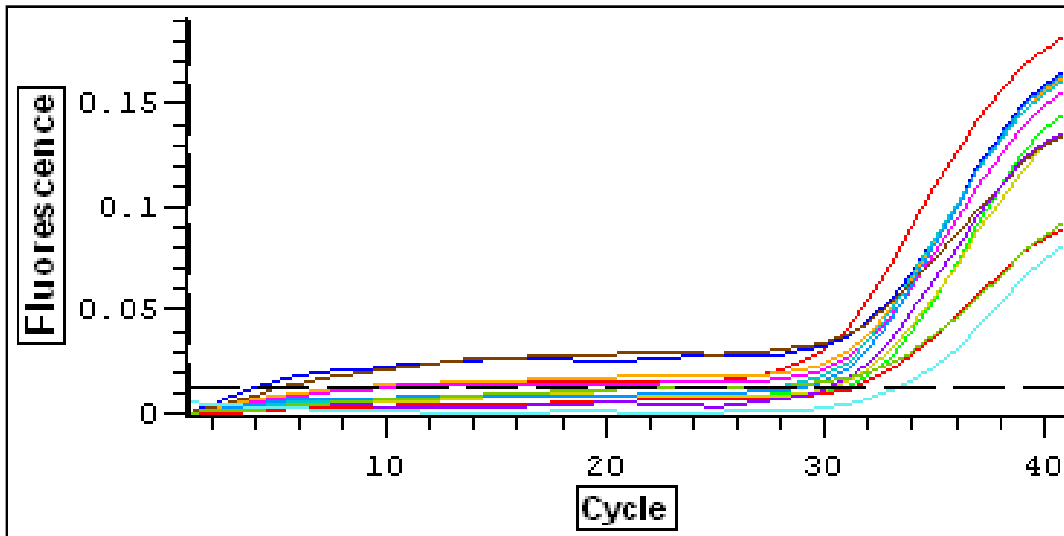


Figura A21. Curvas de amplificación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IL-10.

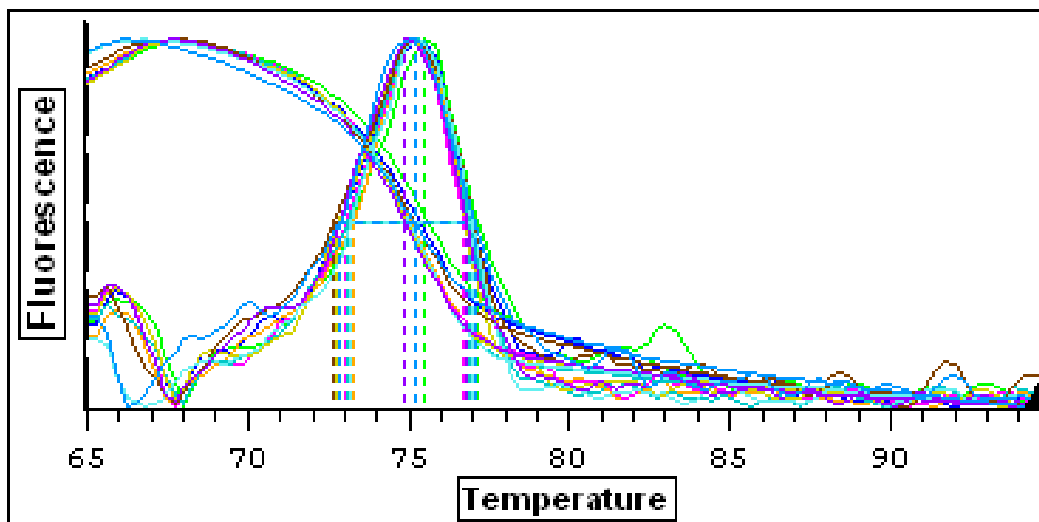


Figura A22. Temperatura de disociación de los productos amplificados con los cebadores para la expresión de IL-10.

**Cuadro A1: Niveles de expresión de las citoquinas de los individuos que no recibieron tratamiento, análisis en base al método de cuantificación relativa.**

<b>INDIVIDUOS NO TRATADOS</b>						
<b>ID</b>	<b>Grupo</b>	<b>IL-1</b>	<b>TNF-alfa</b>	<b>IL2</b>	<b>IL4</b>	<b>IL-10</b>
1	1	286.03	2.06	136.24	64	319.57
2	1	306.55	6.41	100.43	66.49	259.57
3	1	294.07	6.87	107.63	59.71	278.2
4	1	315.17	17.88	147.03	70.03	308.69
5	1	277.24	2.38	126.68	75.06	297.14
6	1	298.17	16.68	137.19	71.51	288.01
7	2	891.44	81.57	0.85	211.57	.
8	2	955.43	.	37.79	232.32	310.83
9	2	882.22	95.01	74.03	218.27	302.33
10	2	948.83	11.27	43.41	202.25	303.38
11	2	867.07	15.45	41.07	.	354.59
12	2	929.3	.	40.5	216.77	290.02
13	2	948.83	95.01	69.07	212.31	282.09
14	2	885.29	2.5	43.71	210.84	330.84
15	2	.	14.42	38.32	.	319.57
16	2	.	11.31	40.36	233.94	326.29
17	2	.	76.11	1.04	216.77	.
18	2	.	2.33	46.85	225.97	308.69
<b>Mediana</b>		<b>874.645</b>	<b>12.865</b>	<b>45.28</b>	<b>211.205</b>	<b>306.035</b>
<b>P75</b>		<b>919.835</b>	<b>32.4375</b>	<b>105.83</b>	<b>217.145</b>	<b>319.57</b>
<b>P25</b>		<b>300.265</b>	<b>5.4325</b>	<b>40.395</b>	<b>71.14</b>	<b>89.5175</b>
<b>IQR</b>		<b>619.57</b>	<b>27.005</b>	<b>65.435</b>	<b>146.005</b>	<b>30.0525</b>

**P75: Percentil 75; P25: Percentil 25; IQR: Rango intercuartílico**

**Cuadro A2: Niveles de expresión de las citoquinas de los individuos que recibieron tratamiento, análisis en base al método de cuantificación relativa**

<b>INDIVIDUOS TRATADOS</b>						
<b>ID</b>	<b>Grupo</b>	<b>IFN-gamma</b>	<b>TNF-alfa</b>	<b>IL-2</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-10</b>
19	1	2683.69	.	51.63	.	556.41
20	1	1552.09	19.43	49.52	.	46.53
21	1	2503.97	9.85	19.29	45.25	60.13
22	1	809	20.82	53.08	.	49.87
23	1	2503.97	2.95	233.94	2.87	3.23
24	1	3983.99	83.87	170.07	59.71	600.49
25	1	2336.28	78.25	158.68	55.72	560.28
26	1	5955.47	.	55.33	.	596.34
27	1	.	10.56	20.68	48.5	64.45
28	1	.	3.16	250.73	3.07	3.46
29	1	.	374.81	154.34	300.25	442.64
30	1	.	401.71	165.42	321.8	474.41
31	2	5752.61	344.89	.	652.58	861.08
32	2	.	.	.	.	989.12
33	2	5367.37	148.06	48.84	2320.15	132.51
34	2	12245.8	245.57	270.6	.	685.02
35	2	7082.29	321.8	.	608.87	922.88
36	2	.	158.68	52.35	2486.67	123.64
37	2	6936.54	229.13	252.48	.	639.15
38	2	5007.93	.	.	.	922.88
<b>Mediana</b>		<b>4495.96</b>	<b>115.965</b>	<b>104.835</b>	<b>179.98</b>	<b>515.41</b>
<b>P75</b>		<b>5904.755</b>	<b>264.6275</b>	<b>186.0375</b>	<b>619.7975</b>	<b>650.6175</b>
<b>P25</b>		<b>2503.97</b>	<b>17.2125</b>	<b>51.1025</b>	<b>47.6875</b>	<b>63.37</b>
<b>IQR</b>		<b>3400.785</b>	<b>247.415</b>	<b>134.935</b>	<b>572.11</b>	<b>587.2475</b>

**P75: Percentil 75; P25: Percentil 25; IQR: Rango intercuartílico**

## Anexo I: Análisis estadístico para la expresión de IFN-gamma

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

```
. swilk ifngamma
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ifngamma	30	0.54483	14.467	5.525	0.00000

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

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

status	obs	rank sum	expected
No tratados	14	113	203
Tratados	14	293	203
combined	28	406	406

unadjusted variance      473.67  
adjustment for ties      -0.26

---

adjusted variance      473.41

Ho: ifngamma(status==No tratados) = ifngamma(status==Tratados)  
z = -4.136  
Prob > |z| = 0.0000



**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 1 (1 día).

```
. ranksum ifngamma if días==1, by(status)

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

status	obs	rank sum	expected
No tratados	6	21	45
Tratados	8	84	60
combined	14	105	105

```

unadjusted variance      60.00
adjustment for ties      -0.13
-----
adjusted variance        59.87

Ho: ifngamma(status==No tratados) = ifngamma(status==Tratados)
      z = -3.102
      Prob > |z| = 0.0019

```

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 2 (7-14 días).

```
. ranksum ifngamma if días==2, by(status)

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

status	obs	rank sum	expected
No tratados	8	36	60
Tratados	6	69	45
combined	14	105	105

```

unadjusted variance      60.00
adjustment for ties      -0.13
-----
adjusted variance        59.87

Ho: ifngamma(status==No tratados) = ifngamma(status==Tratados)
      z = -3.102
      Prob > |z| = 0.0019

```

## Anexo II: Análisis estadístico para la expresión de TNF- $\alpha$

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

```
. swilk tnfalfa
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
tnfalfa	32	0.73433	8.862	4.529	0.00000

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

```
. ranksum tnfalfa, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	16	193	264
Tratados	16	335	264
combined	32	528	528

unadjusted variance      704.00  
adjustment for ties      -0.13

---

adjusted variance      703.87

Ho: tnfalfa(status==No Tratados) = tnfalfa(status==Tratados)  
z = -2.676  
Prob > |z| = 0.0074

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 1 (1 día).

```
. ranksum tnfalfa if dias==1, by(status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	6	33	51
Tratados	10	103	85
combined	16	136	136

unadjusted variance            85.00  
adjustment for ties            0.00  
-----  
adjusted variance            85.00

Ho: tnfalfa(status==No Tratados) = tnfalfa(status==Tratados)  
z = -1.952  
Prob > |z| = 0.0509

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 2 (7-14 días).

```
. ranksum tnfalfa if dias==2, by(status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	10	55	85
Tratados	6	81	51
combined	16	136	136

unadjusted variance            85.00  
adjustment for ties            -0.13  
-----  
adjusted variance            84.88

Ho: tnfalfa(status==No Tratados) = tnfalfa(status==Tratados)  
z = -3.256  
Prob > |z| = 0.0011

### ANEXO III: Análisis estadístico para expresión de IL-2

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

```
. swilk il2
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il2	34	0.87165	4.482	3.126	0.00089

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

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	18	251	315
Tratados	16	344	280
combined	34	595	595

unadjusted variance      840.00  
adjustment for ties      0.00

---

adjusted variance      840.00

Ho: il2(status==No Tratados) = il2(status==Tratados)  
z = -2.208  
Prob > |z| = 0.0272

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 1 (1 día).

```
. ranksum il2 if dias==1, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	6	57	57
Tratados	12	114	114
combined	18	171	171

unadjusted variance      114.00  
 adjustment for ties      0.00

---

adjusted variance      114.00

Ho: il2(status==No Tratados) = il2(status==Tratados)  
 z = 0.000  
 Prob > |z| = 1.0000

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 2 (7-14 días).

```
. ranksum il2 if dias==2, by ( status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	12	82	102
Tratados	4	54	34
combined	16	136	136

unadjusted variance      68.00  
 adjustment for ties      0.00

---

adjusted variance      68.00

Ho: il2(status==No Tratados) = il2(status==Tratados)  
 z = -2.425  
 Prob > |z| = 0.0153

## ANEXO IV: Análisis estadístico para la expresión de IL-4

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

```
. swilk il4
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il4	30	0.38105	19.673	6.160	0.00000

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

```
. ranksum il4, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	16	231.5	232
Tratados	12	174.5	174
combined	28	406	406

unadjusted variance      464.00  
adjustment for ties      -0.25

---

adjusted variance      463.75

Ho:  $il4(status==No\ Tratados) = il4(status==Tratados)$   
z = -0.023  
Prob > |z| = 0.9815

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 1 (1 día).

```
. ranksum il4 if dias==1, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	6	56.5	45
Tratados	8	48.5	60
combined	14	105	105

unadjusted variance            60.00  
adjustment for ties            -0.13  
-----  
adjusted variance               59.87

Ho: il4(status==No Tratados) = il4(status==Tratados)  
z = 1.486  
Prob > |z| = 0.1372

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 2 (7-14 días).

```
. ranksum il4 if dias==2,by(status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	10	55	75
Tratados	4	50	30
combined	14	105	105

unadjusted variance            50.00  
adjustment for ties            -0.11  
-----  
adjusted variance               49.89

Ho: il4(status==No Tratados) = il4(status==Tratados)  
z = -2.832  
Prob > |z| = 0.0046

## ANEXO V: Análisis estadístico para la expresión de IL-10

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

```
. swilk il10
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il10	36	0.91321	3.165	2.409	0.00800

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

```
. ranksum il10, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	16	264	296
Tratados	20	402	370
combined	36	666	666

unadjusted variance            986.67  
adjustment for ties            -0.38  
-----  
adjusted variance              986.29

Ho: il10(status==No Tratados) = il10(status==Tratados)  
z = -1.019  
Prob > |z| = 0.3082



**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 1 (1 día).

```
. ranksum il10 if dias==1, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	6	57	57
Tratados	12	114	114
combined	18	171	171

unadjusted variance      114.00  
 adjustment for ties      0.00  
 -----  
 adjusted variance      114.00

Ho: il10(status==No Tratados) = il10(status==Tratados)  
 z = 0.000  
 Prob > |z| = 1.0000

**Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon:** Análisis entre individuos tratados y no tratados, para el grupo 2 (7-14 días).

```
. ranksum il10 if dias==2, by (status)
```

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

status	obs	rank sum	expected
No Tratados	10	75	95
Tratados	8	96	76
combined	18	171	171

unadjusted variance      126.67  
 adjustment for ties      -0.13  
 -----  
 adjusted variance      126.54

Ho: il10(status==No Tratados) = il10(status==Tratados)  
 z = -1.778  
 Prob > |z| = 0.0754