

## EXPRESIÓN *in vitro* DE LAS INTERLEUCINAS 2 Y 10 DE LINFOCITOS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN PRESENCIA DE ANTÍGENOS CLOSTRIDIALES

### *In vitro* EXPRESSION OF INTERLEUKIN-2 AND -10 FROM ALPACA (*Vicugna pacos*) LEUKOCYTES IN PRESENCE OF CLOSTRIDIAL ANTIGENS

Raquel Watanabe W.<sup>1</sup>, Alberto Manchego S.<sup>1,2</sup>, Hermelinda Rivera G.<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar, mediante la técnica de RT-PCR Tiempo Real y cuantificación relativa según el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , los niveles relativos de expresión *in vitro* de ARN mensajero de IL-2 e IL-10 en leucocitos circulantes de alpacas en presencia de antígenos clostridiales, empleándose como control endógeno a GAPDH. Se colectó sangre entera de 10 alpacas adultas. Las muestras fueron centrifugadas para obtener la fracción leucocitaria en gradiente de Ficoll, colectándose la capa flogística. Se hizo un pool de leucocitos que fueron purificados con cloruro de amonio. Se centrifugó y la concentración se ajustó a 500 000 células vivas/ml de medio mínimo esencial (MEM). Fueron cultivados en placas para cultivo celular de 24 pocillos y enfrentados a suspensiones de extracto clostridial a las concentraciones de 400, 16, 0.8 y 0.2  $\mu\text{g/ml}$  por 1, 12 y 24 h. Posteriormente, se realizó la RT-qPCR. La cinética de la expresión de IL-2 mostró una tendencia no significativa inversamente proporcional a la dosis de antígeno clostridial en los tres tiempos de incubación, a diferencia de IL-10 cuya expresión fue variable, alcanzando el máximo a las 12 h de incubación ( $p < 0.05$ ) y mostrando un patrón similar al de IL-2 en la dosis de 16  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno clostridial. La expresión de IL-10 superó hasta en 40 veces lo expresado por el calibrador respecto a IL-2, evidenciándose una marcada respuesta hacia la polarización del subtipo Th2.

**Palabras clave:** interleucina 2, interleucina 10, *Clostridium perfringens*, RT-PCR tiempo real, cuantificación relativa

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

<sup>2</sup> E-mail: amanchegos@gmail.com

Recibido: 14 de agosto de 2013

Aceptado para publicación: 9 de marzo de 2014

## ABSTRACT

The aim of the study was to determine the relative *in vitro* ARNm expression levels of IL-2 and IL-10 in peripheral blood leukocytes by real time RT-PCR and relative quantification using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method in presence of clostridial antigens and GAPDH as an endogenous control. Whole blood was collected from 10 adult alpacas. Samples were centrifuged to obtain leukocytes using the Ficoll reagent, purified with ammonium chloride and cultured in 24-well plates at a concentration of 500 000 live cells/ml minimal essential medium (MEM) with clostridial extract suspensions at concentrations of 400, 16, 0.8 and 0.2  $\mu\text{g/ml}$ . Subsequently, the RT-qPCR test was performed. IL-2 kinetic expression patterns were inversely proportional to the clostridial antigen dose in the three incubation times ( $p > 0.05$ ), unlike IL-10 which its kinetic expression patterns were variable, reaching its maximum at 12 h ( $p < 0.05$ ) while showing a similar trend like IL-2 in the 16  $\mu\text{g/ml}$  clostridial antigen dose. IL-10 expression exceeded 40-fold the control expression respect to IL-2. A strong polarization towards the Th2 subtype was shown.

**Key words:** interleukin-2, interleukin-10, *Clostridium perfringens*, real time RT-PCR, relative quantification

## INTRODUCCIÓN

La enterotoxemia, denominada también diarrea bacilar, es ocasionada por *Clostridium perfringens* y es la enfermedad infecciosa responsable de las mayores pérdidas económicas que afligen a los productores alpaqueros del Perú. La enfermedad afecta, principalmente, a las crías de las alpacas (*Vicugna pacos*) entre la segunda y novena semana de edad, incluyendo complicaciones con cuadros de colibacilosis (diarrea y septicemia) y de neumonía aguda. El cuadro patológico es consecuencia de un cuadro tóxico primario a nivel intestinal (yeyuno e íleon) que deriva en un cuadro de toxemia generalizada por acción de las toxinas de *C. perfringens* tipo A que ocasionan daños irreversibles en el endotelio vascular y el sistema nervioso. Generalmente, los signos clínicos son de curso agudo y finalizan con la muerte súbita del animal. La enfermedad se observa como brotes o epizootias, con mortalidades que pueden alcanzar el 50% de las crías (Ramírez *et al.*, 1985) o más si se trata de casos severos (FAO, 2005a,b).

Las interleucinas o citoquinas desempeñan un rol importante en la defensa del organismo de humanos y animales frente a infecciones o lesiones; por lo tanto, el desarrollo de las enfermedades puede ser afectado o condicionado por sus respuestas. Su acción en la mediación de la respuesta inmune ha sido ampliamente investigada, especialmente, el patrón de respuesta de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12) y Th2 (IL-4, IL-10, IL-13). La dinámica de la expresión del ARN mensajero (ARNm) de estas interleucinas ha sido estudiada en camélidos del Viejo Mundo (*Camelus dromedarius* y *C. bactrianus*) y del Nuevo Mundo como la llama (*Lama glama*) (Odbileg *et al.*, 2005a,b). Asimismo, han sido clonadas, secuenciadas (Odbileg *et al.*, 2006) y evaluadas en condiciones *in vivo* frente a antígenos de *Brucella abortus* (Odbileg *et al.*, 2008).

Estudios a nivel molecular de perfiles de interleucinas de subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th2 de llamas y camellos bactrianos, especies filogenéticamente emparentadas con las alpacas, han logrado

examinar la expresión de los genes de las interleucinas involucradas en el balance de la respuesta Th1/Th2, revelando respuestas funcionalmente complejas en procesos infecciosos sistémicos. No obstante, son escasos los estudios sobre la inmunidad de la alpaca, habiéndose extrapolado el diseño de los oligonucleótidos empleados en base a las secuencias conservadas y homólogas con otras especies. La cinética de la expresión *in vitro* de algunas interleucinas (IL) de alpacas se ha estudiado en los últimos años, especialmente en la respuesta inmune innata (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Bardález *et al.*, 2012; Tambillo *et al.*, 2012) y adaptativa (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) (Chiock, 2012).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión *in vitro* de las IL-2 e IL-10 en leucocitos circulantes de alpacas incubados con antígenos clostridiales, estableciendo la cinética de producción de los ARNm de estos dos elementos y, de esta manera, brindar una aproximación al comportamiento *in vivo* de los leucocitos sanguíneos en los casos de toxemia generalizada causada por *C. perfringens* en crías de alpacas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención y Procesamiento de Muestras

Se tomaron muestras de sangre con EDTA de 10 alpacas adultas mediante punción de la vena yugular. Las muestras se centrifugaron a 1000 g por 5 min para obtener la fracción leucocitaria en gradiente de Ficoll. Se hizo un pool de leucocitos y se purificaron mediante lisis de eritrocitos con cloruro de amonio, y luego fueron resuspendidos en medio mínimo esencial (MEM) libre de antibióticos.

### Antígenos Clostridiales

Los antígenos de *C. perfringens* se obtuvieron de cepas de campo procedentes de crías de alpacas muertas con cuadros de

enterotoxemia. La cepa fue cultivada en caldo tioglicolato en anaerobiosis e inactivada con formalina 0.05%. Se precipitaron las proteínas totales con ácido tricloroacético (ATC) y se lavaron los restos con acetona. La dosis de antígeno se ajustó a una solución madre de 400  $\mu$ g/ml empleando un fluorómetro Qubit (Invitrogen, EEUU). Posteriormente, se realizaron diluciones con PBS para obtener concentraciones de 80, 16, 0.8 y 0.2  $\mu$ g/ml.

### Activación Leucocitaria

Las suspensiones de antígenos clostridiales en las cinco concentraciones (solución madre más cuatro diluciones) fueron incubadas con leucocitos de alpaca (500 000 células/ml) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en microplacas de poliestireno para cultivo celular de 24 pocillos por 1, 12 y 24 h. Adicionalmente, y por cada periodo de tiempo, se empleó un control de células o calibrador inoculado con suero fisiológico e incubado bajo las mismas condiciones de los tratamientos. Luego de la incubación, se tomaron alícuotas de 300  $\mu$ l y se separaron las células mediante centrifugación a 1000 g por 10 min. Se hizo un recuento de leucocitos de cada tratamiento empleando azul de tripán 0.5% para determinar su viabilidad. La activación de los leucocitos en cada caso fue detenida mediante congelación a -20 °C.

### Extracción del ARN Total y Transcripción Inversa

Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 1500 g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó Trizol (Invitrogen™ Life Technologies, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante, y cloroformo absoluto frío. El ARN fue precipitado con alcohol isopropílico frío y lavado con etanol frío al 70%, luego fue resuspendido con 60  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y congelado a -70 °C hasta su uso.

El ARN obtenido de cada muestra fue tomado como templado para la síntesis del ADN complementario (ADNc) utilizándose

Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados en la RT-PCR Tiempo Real para los genes de IL-2, IL-10 y GAPDH de alpacas

Gen diana	Longitud (bp) <sup>1</sup>	Secuencia de los oligonucleótidos <sup>2</sup>	Ta o Th (°C) <sup>3</sup>	Acceso en el GenBank
IL-2 <sup>4</sup>	202	F: 5'- AAACTCTCCAGGATGCTCAC -3' R: 5'- GGAAGCTGAAGGGATCTGAAA -3'	53	AB246671
IL-10 <sup>4</sup>	246	F: 5'- AAGCCTTGTCGGAGATGAC -3' R: 5'- AGCCATGAGTGAGTTCGACA -3'	55	AB246674.1
GAPDH <sup>5</sup>	356	F: 5'- GTGAAGGTCGGAGTGAACG -3' R: 5'- GAGATGATGACCCTCTTGGC -3'	60	-

<sup>1</sup> bp: longitud del producto expresada en pares de bases

<sup>2</sup> Los iniciadores se expresan como F (cebador de avance) y R (cebador de regreso)

<sup>3</sup> Ta o Th: Temperatura de alineamiento "annealing" o hibridación

<sup>4</sup> Odbileg *et al.* (2006, 2008)

<sup>5</sup> Patit *et al.* (2004)

el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen™, EEUU) usando oligos dT y hexámeros al azar como cebadores.

### PCR Tiempo Real para Genes GAPDH, IL-2 e IL-10

Se emplearon los oligonucleótidos diseñados por Odbileg *et al.* (2006, 2008), basados en secuencias genéticas para bovino y camello para los genes de IL-2 e IL-10 (Cuadro 1). Asimismo, se incluyeron oligonucleótidos específicos para la amplificación específica de transcritos del gen GAPDH (gliceraldehído 3 – fosfato deshidrogenasa) (Patil *et al.*, 2004) como control endógeno para la normalización de la RT-PCR. Se empleó el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las condiciones del PCR Tiempo Real para GAPDH, IL-2 e IL-10 en el termociclador PTC 200 Engine Chromo IV

(MJ Research, EEUU) fueron las siguientes: 50 °C por 2 min (incubación con UDG), 95 °C por 10 min (inactivación del UDG y activación de la ADN polimerasa), seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s (extensión final) y lectura de placa, curva de disociación de 65 hasta 95 °C con lectura de placa cada 0.3 °C, y luego a 4 °C indefinidamente para mantener los productos. Los tubos fueron refrigerados a 4 °C a la finalización del proceso (stop).

El ensayo fue desarrollado por triplicado y los resultados fueron evaluados mediante el software Opticon Monitor v. 2.1, obteniéndose los valores de las curvas de amplificación (Ct, *cycle threshold*) y disociación (Tm, *temperature melting*). La cuantificación relativa de los amplicones de ARNm de las interleucinas 2 y 10 se realizó con el Método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o Método del  $C_T$  comparativo (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Rebrikov y Trofimov, 2006), empleando como calibrador a los leucocitos incubados con suero fisiológico por 1 h.

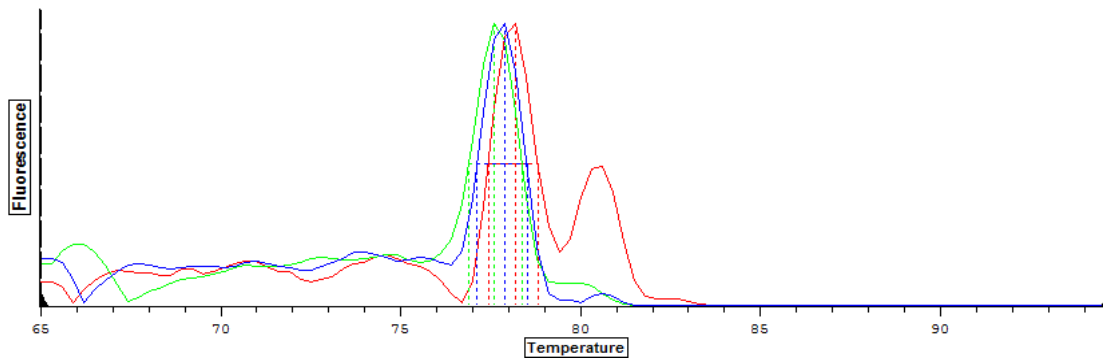


Figura 1. Temperatura de disociación de algunos productos de RT-qPCR para IL-2, procedentes del ARN de leucocitos circulantes de alpacas enfrentados *in vitro* a distintas dosis de antígeno clostridial. Verde: 77.6 °C (0.8 y 16 µg/ml x 1 h, 400 µg/ml x 12 h). Azul: 77.9 °C (0.2 y 400 µg/ml x 1 h, 0.2 y 0.8 µg/ml y suero fisiológico x 12 h; 0.2, 0.8, 16 y 400 µg/ml x 24 h). Rojo: 78.2 °C (suero fisiológico x 1 h, 16 µg/ml y suero fisiológico x 24 h)

Los datos fueron analizados con el software STATA SE 12 utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Comparación Múltiple de Medianas. Adicionalmente, se realizó un análisis de efecto simple para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos (dosis de antígeno clostridial) según el tiempo (periodos de incubación) y viceversa.

## RESULTADOS

Se encontraron cinco temperaturas de disociación para GAPDH (82.1, 82.7, 84.2, 84.5, 84.8 °C). Asimismo, tres temperaturas de disociación con leve ruido de fondo para IL-2 e IL-10 de 77.6, 77.9 y 78.2 °C (Fig. 1) y 74.0, 74.3, 74.6 y 74.9 °C (Fig. 2), respectivamente.

El análisis realizado para comparar la expresión de IL-2 en los tres periodos de incubación de cada tratamiento reveló que todas las dosis de antígeno clostridial favorecieron el incremento de la expresión relativa del ARNm de IL-2 superando al control, a excepción de la dosis máxima de 400 µg/ml.

En la Fig. 3 se puede notar la tendencia progresiva en incremento de la expresión de IL-2, conforme aumenta la dosis de antígeno clostridial y el tiempo de incubación. El análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk estableció que las variables seguían una distribución normal. La prueba de Kruskal Wallis no determinó diferencia estadística entre tratamientos según la dosis de antígeno clostridial y los tiempos de incubación; sin embargo, el análisis factorial encontró diferencia estadística entre tratamientos a las 24 h de incubación y a las dosis de 0.8 y 0.2 µg/ml.

En forma similar, el análisis realizado para comparar la expresión de IL-10 en los tres periodos de incubación de cada tratamiento reveló que los niveles de expresión fueron variables dependiendo de la dosis de antígeno clostridial y el tiempo de incubación. En la Fig. 4 se observan los picos (máxima expresión) a las 12 h de incubación en las concentraciones de 0.2, 0.8 y 400 µg/ml, tendencia que no se evidencia a la concentración de 16 µg/ml. Por otro lado, solo en la dosis de 16 µg/ml se observa un incremento progresivo en la expresión de esta interleucina

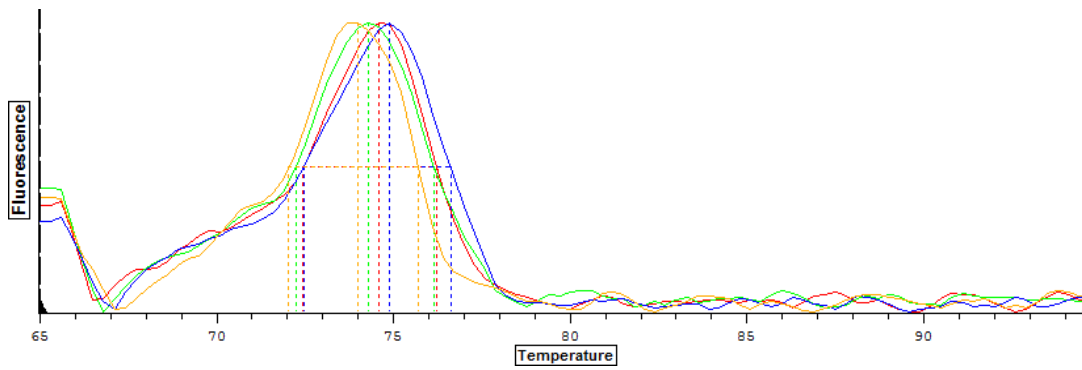


Figura 2. Temperatura de disociación de algunos productos de RT-qPCR para IL-10, procedentes del ARN de leucocitos circulantes de alpacas enfrentados *in vitro* a distintas dosis de antígeno clostridial. Naranja: Tm de 74 °C (400  $\mu$ g/ml x 1 h y 12 h). Verde: 74.3 °C (16  $\mu$ g/ml x 1 h, 0.2  $\mu$ g/ml x 12 h, 16 y 80  $\mu$ g/ml x 24 h). Rojo: 74.6 °C (0.2  $\mu$ g/ml x 1 h; 0.8, 16  $\mu$ g/ml y suero fisiológico x 12 h; 0.2, 0.8 y 400  $\mu$ g/ml x 24 h). Azul: 74.9 °C (suero fisiológico, 0.8 y 400  $\mu$ g/ml x 1 hora, 80  $\mu$ g/ml x 12 h, 0.2  $\mu$ g/ml x 24 h)

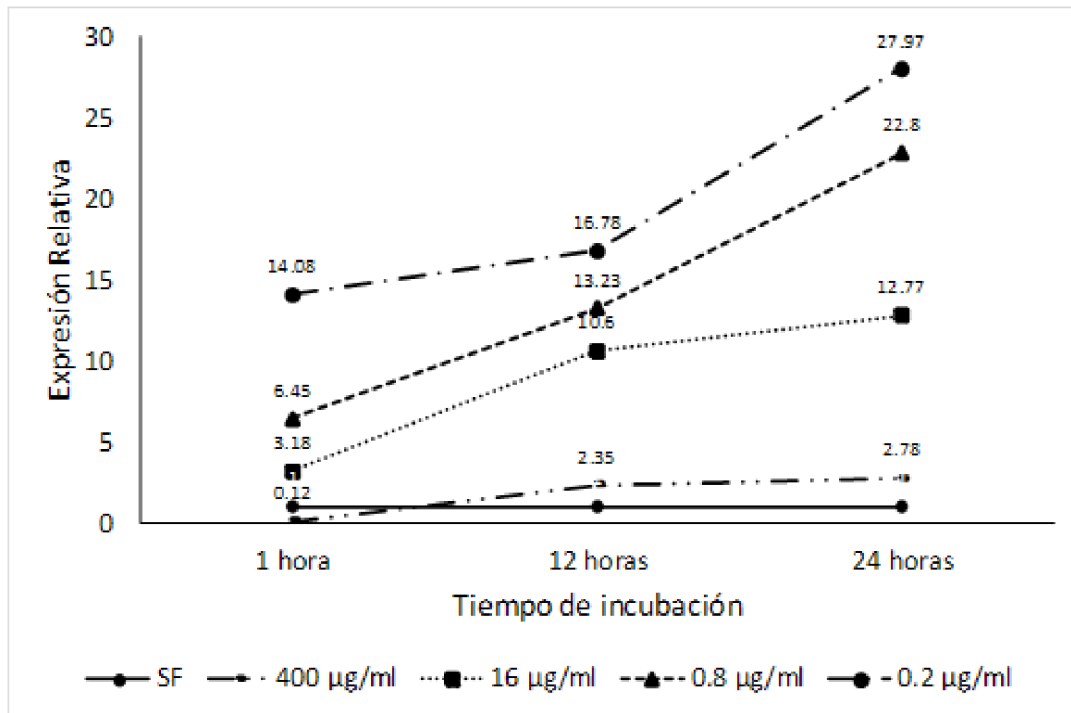


Figura 3. Expresión relativa del ARNm de IL-2 a 1, 12 y 24 h en dosis de 400, 16, 0.8 y 0.2  $\mu$ g/ml de extracto clostridial

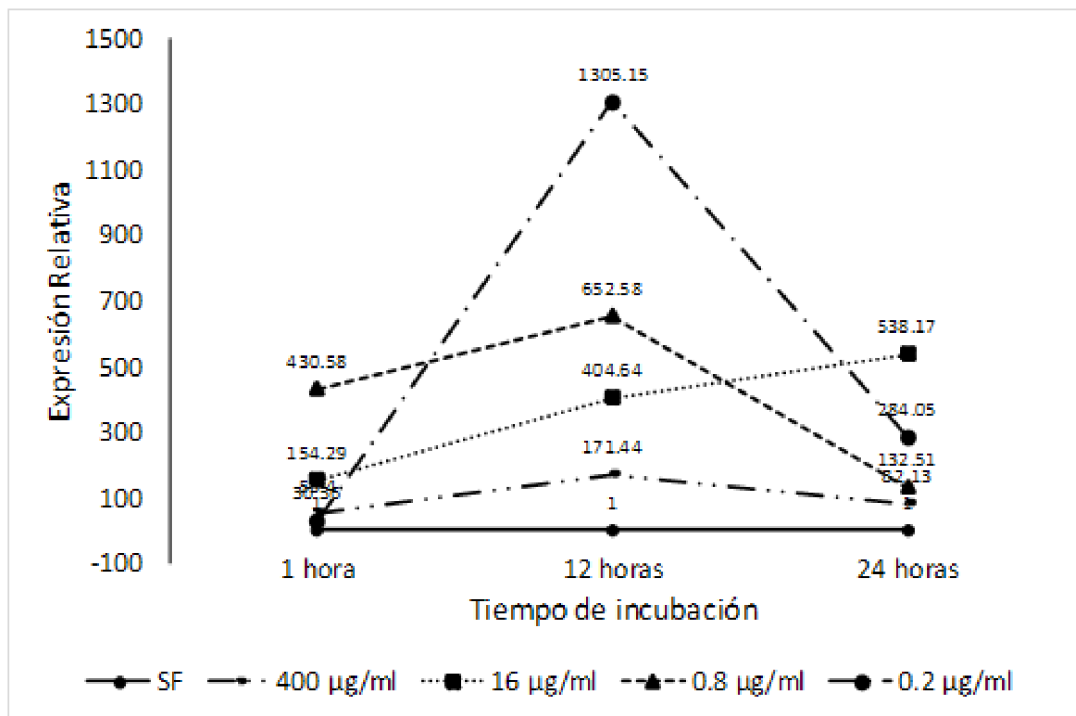


Figura 4. Expresión relativa del ARNm de IL-10 a 1, 12 y 24 h en dosis de 400, 16, 0.8 y 0.2 µg/ml de extracto clostridial

conforme aumenta el tiempo de incubación, mientras que en las dosis de 400, 0.8 y 0.2 µg/ml, la expresión de IL-10 aumenta a las 12 h pero disminuye marcadamente a las 24 h de incubación.

El análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk estableció que las variables no seguían una distribución normal. La prueba de Kruskal Wallis determinó diferencia estadística entre los tratamientos a las 12 h ( $p=0.0444$ ) y 24 h ( $p=0.0361$ ) de incubación. No obstante, la prueba de Comparación Múltiple de Medianas solo determinó diferencia estadística entre 400 y 0.2 µg/ml de antígeno clostridial a las 12 h de incubación. Por otro lado, el análisis factorial indicó diferencia estadística entre tratamientos a las 12 y 24 h de incubación, y a las dosis de 16, 0.8 y 0.2 µg/ml.

La especificidad de los productos de la PCR tiempo real para IL-2 e IL-10 fue corroborada con la electroforesis de los productos en gel de agarosa mostrando el tamaño indicado por Odbileg *et al.* (2005, 2008).

## DISCUSIÓN

El presente estudio cuantificó relativamente la expresión del ARN mensajero de las interleucinas 2 y 10 *in vitro* en leucocitos circulantes de alpacas incubados con cuatro dosis de extracto de *C. perfringens* por 1, 12 y 24 h, siendo la IL-2 una interleucina representativa de la subpoblación linfocida Th1 y la IL-10 de la subpoblación Th2, ambas correspondientes al conjunto de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Se observó un incremento progresivo en la expresión de IL-2 inversamente proporcional a la concentración de antígeno clostridial y directamente proporcional al tiempo de incubación, a excepción de la dosis de 400  $\mu\text{g/ml}$  en 1 h, donde la expresión equivale a la décima parte respecto al grupo control inoculado con suero fisiológico. Esto indicaría una menor producción de esta interleucina debido a la actividad leucotóxica del extracto (Tambillo *et al.*, 2012), dado que la bacteria secreta grandes cantidades y tipos de exotoxinas con actividades enzimáticas y porinas. Esta actividad citotóxica no es tan marcada en las tres dosis menores debido a una mayor cantidad de células viables (datos no mostrados) y, por lo tanto, una mayor estimulación autocrina y paracrina entre las mismas, lo que refuerza la producción total de esta interleucina. No obstante, no se determinó la dosis mínima de extracto que estimularía la síntesis de IL-2 por los leucocitos periféricos.

En el caso de IL-10, los patrones en la cinética de la expresión del ARNm a distintas dosis de extracto de *C. perfringens* varían en los tres tiempos de incubación. Al igual que en IL-2, no se determinó la dosis mínima de extracto capaz de estimular la síntesis de IL-10 en los leucocitos periféricos.

En términos generales, los niveles de expresión de IL-2 superan en menos de 30 veces lo expresado por el calibrador, siendo el máximo de 27.97; mientras que, en IL-10, la mínima y máxima expresiones corresponden a 30.36 y 1305.15 veces lo expresado por el calibrador a la 1 y 12 h de incubación, respectivamente, a la mínima concentración de antígeno clostridial (0.2  $\mu\text{g/ml}$ ). La interpretación de estos eventos dispares debe ser analizada considerando el periodo de incubación para ambas interleucinas que radica en las interacciones inmunológicas que favorecen el predominio de un subtipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y, por lo tanto, de un perfil de interleucinas de la inmunidad adaptativa.

La interleucina más importante producida por los linfocitos T poco después de su activación, a menudo en las 2 a 4 h siguientes al reconocimiento del antígeno y de los coestimuladores, es la IL-2 (Abbas *et al.*, 2012), hecho que explica la cinética uniforme de la expresión de la interleucina en los tres tiempos de incubación a medida que disminuye la concentración de antígeno clostridial.

Los macrófagos responden a los microorganismos secretando interleucinas y expresando coestimuladores que potencian la activación de los linfocitos T y la inmunidad celular. La IL-10 actúa sobre los macrófagos activados bajo dos formas. La primera es la inhibición de la síntesis de IL-12 por las células dendríticas y macrófagos activados (Abbas *et al.*, 2012). La IL-12 es un estímulo crítico para la secreción de IFN- $\gamma$  y es un inductor de las relaciones inmunitarias innatas y celulares frente a los microorganismos intracelulares. En consecuencia, la IL-10 actúa inhibiendo estas reacciones, a la vez que favorece indirectamente la polarización del subgrupo Th2 sobre el Th1 por inhibición de esta interleucina. La segunda consiste en la inhibición de la expresión de coestimuladores y moléculas del CMH clase II sobre los macrófagos y células dendríticas (Abbas *et al.*, 2012). Por lo tanto, la IL-10 actúa inhibiendo la activación de los linfocitos T y finalizando las reacciones inmunitarias celulares a través de los linfocitos T reguladores.

Por otro lado, la IL-10 inhibe la actividad de linfocitos NK (células citotóxicas naturales) y la síntesis de las interleucinas de linfocitos Th1 (IL-1, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ), a la vez que actúa en macrófagos activados para suprimir la secreción de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y radicales reactivos de oxígeno (Tizard, 2009). Es probable que los resultados de Tambillo (2012) se hayan debido, fundamentalmente, a la acción de esta interleucina sobre la producción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , cuyas expresiones de ARN mensajero también fueron evaluadas a las mismas dosis de antígeno



clostridial por los mismos tiempos de incubación.

Estos resultados contrastan con los hallazgos de Wallace *et al.* (1999) en un estudio *in vitro* e *in vivo* de la respuesta de cinco interleucinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2) sometidas a la enterotoxina de *C. perfringens* (CPE), donde se observó la actividad mitogénica de la enterotoxina al inducir la síntesis de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por los macrófagos, mas no de IL-2 dentro de las 24 h de incubación y muerte celular total a las 48 h. Esos hallazgos difieren con aquellos del presente estudio en cuanto a la producción de IL-2, donde se evidencia amplificación de ARNm de esta interleucina. No obstante, debe mencionarse que en ese estudio se empleó un kit de ELISA para la cuantificación absoluta y se basó, principalmente, en la evaluación de la interacción de la respuesta inmune innata y no de la adquirida.

Es evidente que en el presente estudio existe un predominio en la polarización hacia el subtipo Th2 en comparación al Th1, tendencia que se observa en los tres periodos de incubación, no solo por el efecto de IL-10 sobre IL-2, sino además, por interacciones paralelas orquestadas de otras interleucinas específicas de ambos subgrupos como IL-4 e IFN- $\gamma$ , y que no fueron evaluadas. Es sabido que estas dos interleucinas se inhiben mutuamente, aunque la ausencia de una no impida la regulación de la otra, como ha sido demostrado para IL-4 en relación a IFN- $\gamma$  (Yagi *et al.*, 2010). Estos hallazgos contrastan con los resultados de estudios *in vitro* en mucosa intestinal de alpacas (Chiok, 2012; More, 2013), en los que se observa una polarización hacia el fenotipo Th1, lo que podría sugerir la influencia e interacción con componentes intrínsecos inmunes del microambiente intestinal y la microflora.

Los linfocitos Th2 presentan receptores para IL-1 y pueden responder a la IL-1 coestimuladora procedente de los macrófagos o de las células dendríticas. La IL-1 puede secretarse a los fluidos tisulares (IL-1 $\alpha$ ) o

permanecer unida a la superficie celular (IL-1 $\beta$ ), donde estimulará a los linfocitos T unidos (Tizard, 2009). Esta característica singular puede sugerir una lógica en los hallazgos de Tambillo *et al.* (2012) con los del presente estudio, donde los niveles de expresión de ARNm de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se mantuvieron por debajo del calibrador a la 1 y 12 h de incubación (con excepción de las 24 h). Por lo tanto, puede asumirse que esta interleucina, aún en niveles pequeños, ejerció un efecto de retroalimentación positiva en las células Th2 reforzando sus acciones biológicas. Además, si sus niveles de expresión no fueron tan marcados, pudo deberse a la acción paralela ejercida por IL-4 al bloquear la síntesis de IL-12, suprimiendo la polarización hacia células Th1.

Los valores y variaciones de temperatura en las curvas de disociación de los productos amplificados se encontraron también en el estudio de Chiok (2012). Podría tratarse de variaciones en la composición de bases en los productos amplificados como resultado del muestreo de alpacas procedentes de zonas geográficas distintas, así como a híbridos de camélidos sudamericanos con similar fenotipo pero diferente genotipo (Kadwell *et al.*, 2001). Una explicación adicional para estos hallazgos podría ser atribuida a los polimorfismos genéticos, específicamente aquellos de nucleótido simple (SNPs) (Vignal *et al.*, 2002). También puede ser el resultado de mecanismos que regulan la expresión génica en su etapa postranscripcional como es el splicing «corte y empalme» alternativo y la edición del ARNm (Black, 2003).

En el presente estudio no se pudo determinar fehacientemente la existencia de polimorfismos o isoformas de ARNm de IL-2 ni de IL-10 en alpacas, lo que solo sería posible mediante el secuenciamiento nucleotídico de los productos de la RT-PCR Tiempo Real y análisis funcionales posteriores de tales variaciones, considerando que la secuenciación del ADN es el *gold standard* para la detección de polimorfismos.

Existe una baja probabilidad de haberse cuantificado formas de ARNm inmaduro o pre-ARNm, llamado también ARNm precursor, debido a que tales formas suelen tener diversos tamaños en longitud pares base (pb) (Sánchez-Sánchez y Mitnacht, 2008). Tales formas hubieran sido visibles en los geles de agarosa realizados sobre los productos finales como bandas múltiples de diferentes tamaños; sin embargo, todos los geles evaluados demostraron un solo producto de tamaño compatible con el cDNA del ARNm secuenciado por Odbileg *et al.* (2006 y 2008), descartando esta posibilidad (Chiok, 2012).

Los resultados obtenidos en el presente estudio usando los oligonucleótidos para el gen GAPDH evidenciaron la presencia de cinco productos amplificados en un rango de 82.1 a 84.8 °C, los cuales variaban en 0.3 °C, encontrándose una temperatura de disociación predominante de 82.7 °C (33.2%), seguida por una de 82.1 y otra de 84.2 °C (26.7%) y dos temperaturas de 84.5 y 84.8 °C (6.7%). Esto concuerda con otros resultados realizados en mucosa intestinal de crías de alpaca (More *et al.*, 2011; Bardález *et al.*, 2012). Es posible que esto se deba, al igual que en el caso de IL-2 e IL-10, a polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) o a la regulación post-transcripcional del ARNm. El presente estudio no determina la existencia de relación entre las posibles variantes y factores geográficos o poblacionales, ni las consecuencias de la expresión de uno u otro polimorfismo de GAPDH.

## CONCLUSIONES

- Los leucocitos sanguíneos de alpacas estimulados por antígenos clostridiales expresaron ARN mensajero de IL-2 e IL-10.
- Se observó un incremento gradual no significativo en la expresión del ARN mensajero de IL-2 inversamente proporcional a la concentración de antígeno clostridial en los tres tiempos de

incubación y una cinética variable en IL-10, observándose una expresión gradual a la dosis de 16 µg/ml ( $p < 0.05$ ) y la máxima expresión a la dosis mínima de extracto clostridial a las 12 h de incubación ( $p < 0.05$ ).

- Se encontró una polarización de la respuesta inmune hacia el fenotipo Th2.

## LITERATURA CITADA

1. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012.** *Inmunología celular y molecular.* 7ª ed. Madrid: Elsevier. 212 p.
2. **Bardález C, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Pezo D, Ramírez M. 2012.** Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. *Rev Inv Vet Perú* 24: 381-389.
3. **Black DL. 2003.** Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
4. **Chiok K. 2012.** Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2) y Th2 (IL-4, IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis de Magíster. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 88 p.
5. **[FAO] Food and Agriculture Organization. 2005a.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Perú: Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina TCP/RLA/2914. 62 p.
6. **[FAO] Food and Agriculture Organization. 2005b.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Argentina. Argentina: Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina TCP/RLA/2914. 38 p.

7. **Kadwell M, Fernandez M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001.** Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc R Soc Lond B* 268(1485): 2575-2584.
8. **Livak K, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* 25: 402-408.
9. **More J, Manchego A, Sandoval N, Ramírez M, Pezo D, Chiok KL, Rivera H. 2011.** Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos ( $\alpha$  y  $\beta$  defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 22: 324-335.
10. **More J. 2013.** Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 104 p.
11. **Obdileg R, Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2005a.** Quantification of llama inflammatory cytokine mRNAs by real-time RT-PCR. *J Vet Med Sci* 67: 195-198.
12. **Obdileg R, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2005b.** Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of Camelidae (llama and camel). *J Vet Med Sci* 67: 921-925.
13. **Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2006.** Complete cDNA sequences and phylogenetic analysis of the Th1 and Th2 cytokines of the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Vet Med Sci* 68: 941-946.
14. **Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z, et al. 2008.** Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*) vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *J Vet Med Sci* 70: 197-201.
15. **Patil A, Hughes AL, Zhang G. 2004.** Rapid evolution and diversification of mammalian  $\alpha$ -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Gen* 20: 1-11.
16. **Pfaffl, MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007.
17. **Ramírez A, Huamán D, Ellis R. 1985.** Enterotoxemia de la alpaca. INIPA-Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Colorado State University. Serie de Reportes Técnicos 63: 1-40.
18. **Rebrikov DV, Trofimov D. 2006.** Real-Time PCR: A review of approaches to data analysis. *Appl Biochem Microbiol* 42: 455-463.
19. **Sánchez-Sánchez F, Mittnacht S. 2008.** Nonsense-mediated decay: paving the road for genome diversification. *Bioessays* 30: 926-928.
20. **Tambillo L, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Rivera H. 2012.** Evaluación *in vitro* de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Rev Inv Vet Perú* 24: 510-523.
21. **Tizard IR. 2009.** Introducción a la inmunología veterinaria. 8ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders. 592 p.
22. **Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. 2002.** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34: 275-305.
23. **Yagi R, Junntila IS, Wei G. 2010.** The Transcription Factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon- $\gamma$ . *Immunity* 32: 507-517.
24. **Wallace FM, Mach AS, Keller AM, Lindsay JA. 1999.** Evidence for *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) inducing a mitogenic and cytokine response *in vitro* and a cytokine response *in vivo*. *Curr Microbiol* 38: 96-100.