

CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) E INTERLEUCINA 1 ALFA (IL-1 α) EN MUCOSA INTESTINAL DE CRÍAS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) SANAS Y CON ENTEROPATÍA

KINETICS OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α) AND ILTERLEUKIN 1 ALPHA (IL-1 α) EXPRESSION IN INTESTINAL MUCOSA OF HEALTHY AND WITH ENTEROPATHY YOUNG ALPACAS (*VICUGNA PACOS*)

Carla Bardález C.¹ Alberto Manchego S.^{1,4}, Kim Lam Chiok C.¹,
Nieves Sandoval C.², Juan More B.¹, Danilo Pezo C.³, Mercy Ramírez V.¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la presencia y niveles de expresión de los ARNm del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 1 alfa (IL- α) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Se trabajaron 71 muestras de yeyuno de alpacas de 0 a 45 días de edad [sanas (n=38) y con enteropatía (n=33)] provenientes del distrito de Maranganí, Cusco. Se extrajo el ARN total de las muestras y se procedió a la transcripción reversa (RT) para obtener las cadenas complementarias de ADN (ADNc). Posteriormente se realizó la PCR convencional y PCR tiempo real. El 98.6% (70/71) de las muestras amplificaron un producto específico de 251 pb para TNF- α y el 100% (71/71) de las muestras amplificaron un producto de 172 pb para IL-1 α , demostrados en la electroforesis mediante bandas en gel de agarosa. En la PCR tiempo real, el análisis de las curvas y temperaturas de disociación (Tm) de los productos indicó: a) para TNF- α , la presencia de un producto específico con una Tm entre 85.1 y 86 °C en las muestras; b) los productos de la IL-1 α fueron específicos con una Tm entre 78.8 y 79.7 °C. La cuantificación relativa del ARNm, utilizando el método 2 Delta Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), demostró que la expresión de ambas citoquinas fue mayor en alpacas enfermas que en sanas ($p < 0.05$). Los niveles de expresión de ambas citoquinas mostraron una tendencia creciente en las primeras cuatro semanas de vida y una caída paulatina en la quinta y sexta semana en animales sanos, mientras que en animales enfermos no existió asociación entre la expresión de las citoquinas y la edad.

Palabras clave: alpacas, TNF- α , IL-1 α , citoquinas, PCR, RT-PCR tiempo real, cuantificación relativa

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, ² Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

³ Estación Experimental del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA-Maranganí), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Maranganí, Cusco

⁴ E-mail: amanchegos@unmsm.edu.pe

Recibido: 1 de junio de 2012

Aceptado para publicación: 17 de febrero de 2013

ABSTRACT

The aim of this study was to determine by real-time RT-PCR the presence and relative levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1 alpha (IL-1 α) mRNA expression in intestinal mucosa of healthy and with enteropathy young alpacas (*Vicugna pacos*) from Cusco, Peru. A total of 71 samples of jejunum from 0 to 45 days old healthy (n=38) and diseased (n=33) alpacas were processed. Total RNA was extracted from samples and to the synthesis of DNA complementary strand (cDNA) by reverse transcription (RT) was done. Subsequently, conventional PCR and real time RT-PCR was conducted. The results showed that 98.6% (70/71) of the samples amplified a specific product of 251 pb for TNF- α and 100% (71/71) of the samples amplified a specific product of 172 pb for IL-1 α , evidenced in the agarose gel during electrophoresis. Analysis of dissociation curves determined that: a) the products amplified with the set of primers for TNF- α were specific and had a melting temperature (T_m) between 85.1 and 86 °C, b) the products of IL-1 α were specific with a T_m between 78.8 and 79.7 °C. The relative quantification of mRNA during real time RT-PCR using the 2 Delta Delta Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) showed that the expression of both cytokines was significantly higher in diseased than in healthy alpacas ($p < 0.05$). The expression levels of both cytokines showed an increasing trend in the first four weeks and a gradual decline in the fifth and sixth weeks in healthy animals, whereas in diseased animals none association was found between the expression of cytokines and age.

Key words: alpaca, TNF- α , IL-1 α , cytokines, PCR, real-time RT-PCR, relative quantification

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas representan la mayor causa de morbilidad y mortalidad en las crías de alpaca en el país. Sin embargo, son escasas las investigaciones orientadas al conocimiento del desarrollo y establecimiento de la respuesta inmune de mucosas en esta especie (Fernández-Baca, 1991; Ramírez *et al.*, 1998).

En el marco de la respuesta inmune innata de mucosas, el reclutamiento de células fagocíticas y moléculas efectoras al sitio de la infección o daño da lugar a la inflamación, la cual es mediada por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Castellanos *et al.*, 2000). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 alfa (IL-1 α) son citoquinas de la inmunidad innata mediadoras de la inflamación cuya principal función es la estimulación del reclutamiento de

neutrófilos y monocitos en los focos de infección y la activación de estas células para erradicar microorganismos. Dichas citoquinas logran estos efectos estimulando la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria y quimioquinas en células endoteliales y macrófagos, respectivamente (Abbas *et al.*, 2008).

Diversos estudios han evaluado la expresión y producción de citoquinas en células de la mucosa intestinal en animales y humanos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Se pudo comprobar la capacidad de los macrófagos, células dendríticas y linfocitos de mucosa para producir IL-1, IL-8 (Seydel *et al.*, 1997), TNF- α e IL-6 (Linevsky *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2010) en respuesta a daños químicos o presencia de microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella dublin*, *Shigella dysenteriae* (Li *et al.*, 1998), *Clostridium difficile* (Linevsky *et al.*, 1997),

Campylobacter jejuni (Jones *et al.*, 2003) y *Clostridium perfringens* (Lu *et al.*, 2009). De la misma manera, los enterocitos son capaces de producir IL-1 α , IL-1 β (Jones *et al.*, 2003), IL-6, IL-8, GM-CSF, GRO-a, TNF- α (Seydel *et al.*, 1997; Denning *et al.*, 2000), IFN-d y NO (Williams, 2001) después de la exposición a infección, toxinas bacterianas o citoquinas proinflamatorias.

Odbileg *et al.* (2005) realizó la clonación, secuenciación y cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias de llama (*Lama pacos*) en células mononucleares de sangre periférica; sin embargo, aun no se ha determinado la presencia genómica ni la expresión de dichas citoquinas en la alpaca (*Vicugna pacos*). El presente trabajo buscó caracterizar, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, la presencia y cinética de expresión del TNF- α e IL-1 α en mucosa intestinal de alpacas durante los primeros 45 días de vida, tanto en individuos sanos como enfermos. Los resultados de esta investigación podrán aplicarse en el desarrollo de herramientas de prevención de enfermedades entéricas en alpacas, basadas en la activación y modulación de la inmunidad de mucosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Muestras

Se trabajaron muestras de yeyuno obtenidas de 71 crías de alpaca (38 sanas y 33 enfermas con enteropatía) de 0 a 45 días de edad sin considerar sexo o variedad, procedentes de criadores de camélidos sudamericanos del distrito de Maranganí, Cusco, Perú. Se consideraron crías con enteropatía a aquellas que tuvieron diarrea con signo clínico de enfermedad intestinal.

Los animales sanos fueron divididos en siete grupos: un grupo calibrador y un grupo por cada semana de edad hasta la sexta semana. El grupo calibrador estuvo compuesto

de cinco animales sanos recién nacidos sin consumo de calostro. Los animales enfermos fueron divididos en seis grupos según su edad en semanas hasta la sexta semana. Se tuvo un mínimo de cinco individuos por grupo etario.

Se obtuvieron muestras de 2 cm de longitud de la porción media del yeyuno. Las muestras fueron lavadas con suero fisiológico al 0.9%. Se realizó el raspado profundo de la mucosa con hojas de bisturí. Se obtuvieron dos alícuotas por cada muestra y se conservaron a -196 °C.

Elección de Oligonucleótidos

Para la detección del TNF- α e IL-1 α se emplearon los set de oligonucleótidos específicos diseñados por Odbileg *et al.* (2005) en un estudio de cuantificación del ARNm de citoquinas inflamatorias en la llama (*Lama glama*). Además, se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen *GAPDH* (gliceraldehído 3 - fosfato deshidrogenasa) (Patil *et al.*, 2004) usado como control endógeno. Las secuencias de oligonucleótidos del TNF- α , IL-1 α y *GAPDH* se muestran en el Cuadro 1.

Detección de ARNm de TNF- α e IL-1 α

Extracción de ARN total. Se procesaron las muestras de mucosa con el reactivo *Trizol*® *Reagent* (Invitrogen, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis de ADNc (Transcripción reversa). Se empleó el kit *SuperScript*™ *III Platinum*® *SYBR*® *Green Two-Step qRT-PCR Kit with Rox* (Invitrogen, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR convencional. Se utilizó el Kit *Go taq*® *Hot Start Colorless Master Mix* (Promega, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el termociclador *Thermal Cycler PTC-200 Chromo 4* (MJ Research, EEUU) con el siguiente protocolo: 94 °C por

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio

Gen	Longitud	Secuencia	T° hibridación	Autor
<i>TNF-α</i>	251 pb	F: 5' CTA ₃ CTCCCAGGTCCTCTTCA 3' R: 5' GGTAGTTGGGCATGTTGATC 3'	56 °C	Odbileg <i>et al.</i> , 2005
<i>IL-1α</i>	172 pb	F: 5' GATGCCTGAGACACCCAA 3' R: 5' GAAAGTCAGTGATCGAGGG 3'	57 °C	Odbileg <i>et al.</i> , 2005
<i>GAPDH</i>	356 pb	F: 5' GTGAAGGTCGGAGTGAACG 3' R: 5' GAGATGATGACCCTCTTGGC 3'	60 °C	Patil <i>et al.</i> , 2004

2 min para la desnaturalización inicial, luego 40 ciclos de 94 °C por 20 s, X °C por 20 s, donde X = T° de hibridización según oligonucleótido, y 72 °C por 40 s. Luego se realizó una extensión final a 72 °C por 5 min, finalizando la reacción a 4 °C. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las bandas de ARN teñidas con bromuro de etidio fueron visualizadas en un transiluminador UV (UltraLum, EEUU).

Expresión de TNF- α e IL-1 α

PCR en Tiempo Real. Se empleó el kit *SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green Two-Step qRT-PCR Kit with Rox* (Invitrogen, USA). La mezcla de reacción constó de 10 ml de SYBR Green super mix, 0.4 ml de cada oligonucleótido (10 mM), 1 ml de Rox diluido (1:10), 6.2 ml de agua libre de nucleasas y 2 ml de ADNc de cada muestra, obteniéndose un volumen final de 20 ml por reacción. Se programó el siguiente protocolo: 50 °C por 2 min (Incubación con UDG), 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, X °C por 30 s, donde X = T° hibridización según oligonucleótido, 72 °C por 30 s. El software Opticon Monitor 2 v2.0.3 analizó la curva de amplificación (Ct) y la temperatura de disociación (Tm) de los productos amplificados.

Cuantificación relativa del TNF- α e IL-1 α .

La cuantificación relativa se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar versus un gen control (normalizador) y posteriormente la comparación con una muestra calibrador (Pfaffl, 2001; Mallona, 2008; Vinuesa-Burgos *et al.*, 2009). Se utilizó el método 2 Delta Delta Ct ($\Delta\Delta$ CT) (Livak y Schmittgen, 2001), el cual presenta los resultados como cantidades en número de veces con respecto a un calibrador (en este caso animales de 0 días de edad y sin consumo de calostro). Las cantidades relativas de las muestras fueron agrupadas y promediadas por semanas de edad.

Análisis Estadístico

La diferencia de expresión de ambas citoquinas entre los grupos sanitarios se analizó mediante la prueba de T de Student. Para evaluar la diferencia de expresión de ambas citoquinas entre los grupos etarios se utilizó el análisis de varianza de un factor y la prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar los grupos diferentes. La posible asociación entre la edad y la cantidad de citoquinas expresadas se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Se utilizó el paquete estadístico STATA v. 11.0, estableciendo la significación estadística en 0.05.

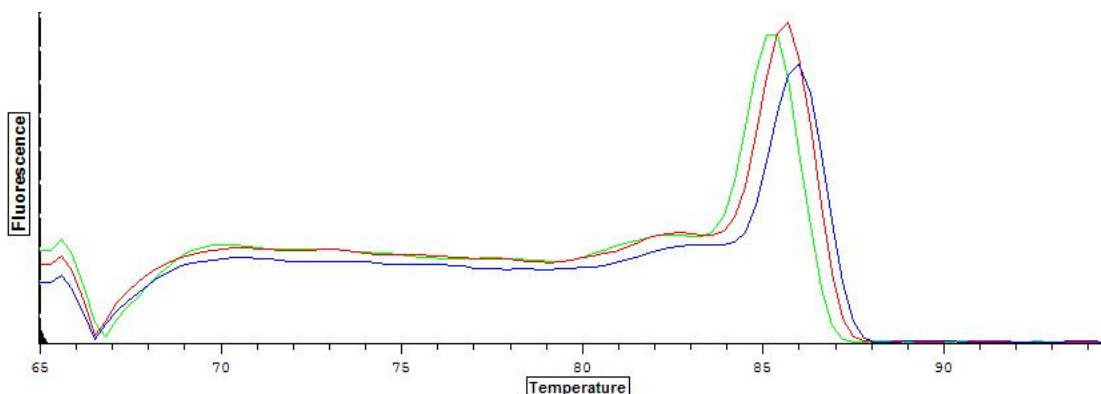


Figura 1. Curva de disociación (T_m) de los productos amplificados con el juego de oligonucleótidos TNF- α . La curva de color verde representa un producto con T_m de 85.4 °C, la curva roja muestra un producto con T_m de 85.7 °C y la curva azul muestra un producto con T_m de 86.0 °C

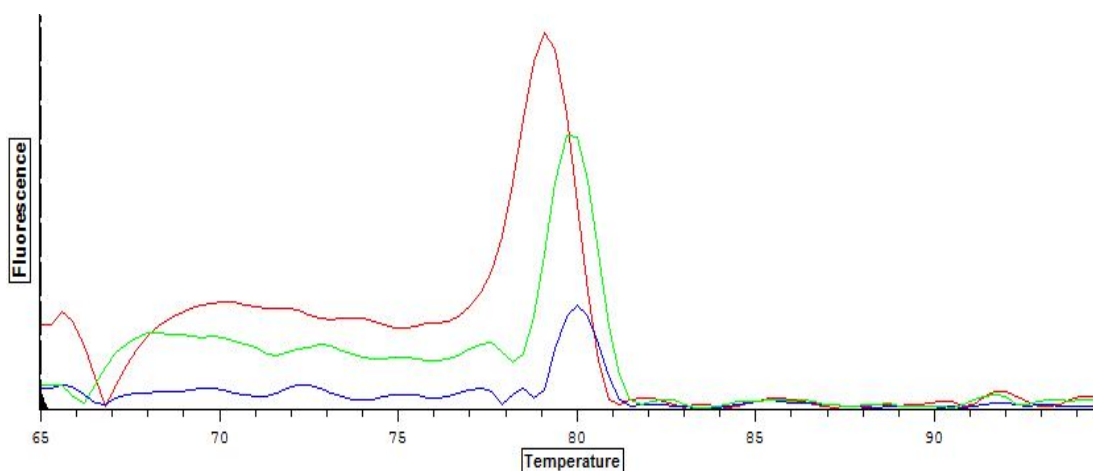


Figura 2. Curva de disociación (T_m) de los productos amplificados con el juego de oligonucleótidos para IL-1 α en mucosa intestinal de cría de alpaca. Se observan curvas de color rojo, verde y azul las cuales representan productos con T_m de 79.1, 79.7 y 80.0 °C, respectivamente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de la PCR con el set de oligonucleótidos diseñados para TNF- α e IL-1 α , la electroforesis de los productos mostró que el 98.6% de las muestras (70/71) evidenciaron la amplificación de un producto de aproximadamente 250 pb en el caso de TNF- α y que

todas las muestras (n=71) presentaron una única banda específica de 170 pb aproximadamente para IL-1 α , similar a los tamaños previstos y obtenidos por Odbileg *et al.* (2005) en llamas.

La curva de disociación de los productos durante la RT-PCR en tiempo real mostró un pico único a una temperatura entre 85.4

y 86.0 °C para TNF- α (Fig. 1) y entre 78.8 y 80.0 °C para IL-1 α (Fig. 2), pudiéndose determinar temperaturas de disociación (T_m) muy cercanas pero diferentes (3 para TNF- α y 5 para IL-1 α) entre los amplicones resultantes. Estos resultados determinan la existencia de variantes de transcritos con diferencias muy ligeras, posiblemente debido a polimorfismos de nucleótido simple (SNP), los cuales son cambios de una sola base en cierta secuencia de ADN o ser resultado de mecanismos que regulan la expresión génica en su etapa post-transcripcional como es el corte (splicing) alternativo y la edición del ARNm (Black, 2003). El presente estudio no puede establecer con certeza la existencia de polimorfismos o isoformas de ARNm de TNF- α ni de IL-1 α en alpacas, ya que solo sería posible mediante el secuenciamiento nucleotídico de los productos del RT-PCR tiempo real y modelamientos funcionales de tales variaciones (Vignal *et al.*, 2002).

Los resultados de la cuantificación relativa demostraron que el nivel promedio de expresión de TNF- α fue mayor en el grupo de animales enfermos (14.3 veces lo expresado por el calibrador) frente al grupo de animales sanos (10.2 veces lo expresado por el calibrador). En el caso de IL-1 α , las crías enfermas expresaron en promedio 22.2 veces lo expresado por el calibrador, mientras que las crías sanas expresaron solo 17 veces lo expresado por el calibrador. Estos resultados demuestran que los animales aparentemente sanos de 0 a 45 días de edad expresaron niveles perceptibles de dichas citoquinas, a pesar de no presentar signos de enfermedad intestinal. Esta expresión jugaría un rol crítico en la homeostasis de la mucosa intestinal e indicaría que el intestino de alpacas sanas es un sitio inmunológicamente activo (Jergens *et al.*, 2009). Este hallazgo podría también ser consecuencia de infecciones entéricas subclínicas o periodos de incubación de patógenos.

Los resultados cuantitativos por semanas de edad muestran un patrón o cinética de expresión similar en ambas citoquinas, las

cuales se elevan y disminuyen en forma conjunta en todas las semanas de edad evaluadas. Esto se explica por el mecanismo de cascada de citoquinas pro-inflamatorias en el que el TNF- α es capaz de actuar sobre los fagocitos mononucleares y otras células para estimular la secreción de IL-1. Además de esta coestimulación, lo anterior se atribuye al sinergismo y redundancia existente entre estas dos citoquinas para lograr sus acciones en el endotelio vascular y leucocitos. Son muy pocos los ejemplos en el que el sinergismo entre IL-1 α y TNF- α no ha sido demostrado (Assuma *et al.*, 1998).

Los niveles de expresión promedio tanto de TNF- α (Fig. 3) como de IL-1 α (Fig. 4) con respecto al calibrador en crías de alpaca sanas exhiben una tendencia creciente en las primeras cuatro semanas de vida, para caer de manera paulatina en la dos semanas siguientes. Todos los grupos etarios consecutivos fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), excepto al comparar la primera con la segunda semana de edad para IL-1 α . La relación entre edad y cantidad expresada de las citoquinas en crías sanas tuvo significación estadística según el coeficiente de correlación de Spearman.

Se presume que la cinética observada estaría asociada al enfrentamiento continuo y creciente del sistema inmune de la mucosa intestinal de animales neonatos con microorganismos del medio ambiente como el suelo, pasturas o pezones contaminados de la madre (Cid y Martín, 2010), así como al crecimiento global del tracto gastrointestinal. En el transcurso de las primeras semanas de vida aumenta el grado de exposición y el número de microorganismos invasores en el intestino, aumentando la respuesta inmune de la mucosa, tanto innata como adaptativa. El inicio paulatino de la ingesta de forraje supone también un cambio y desequilibrio en la microflora intestinal (Pieper *et al.*, 2006), lo que estimula al sistema inmune y se correlaciona con los niveles crecientes de TNF- α e IL-1 α hasta la cuarta semana. La disminución de estas citoquinas en la quinta y

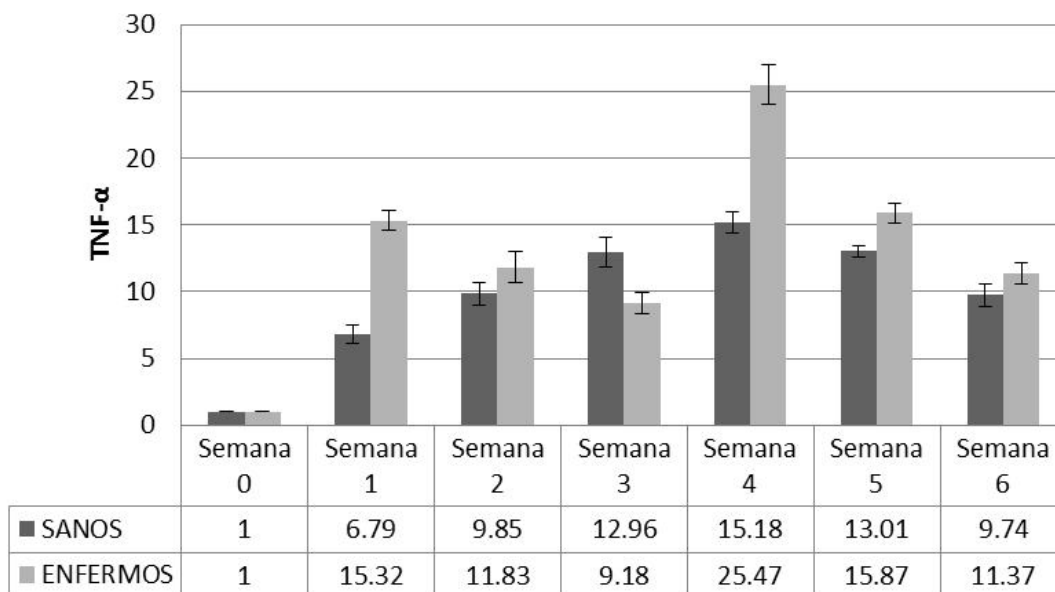


Figura 3. Niveles de expresión de TNF- α en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semana de edad. Cada barra representa la media \pm DE por grupo etario. Hubo diferencia estadística ($p < 0.05$) al comparar animales sanos con enfermos en todos los grupos etarios

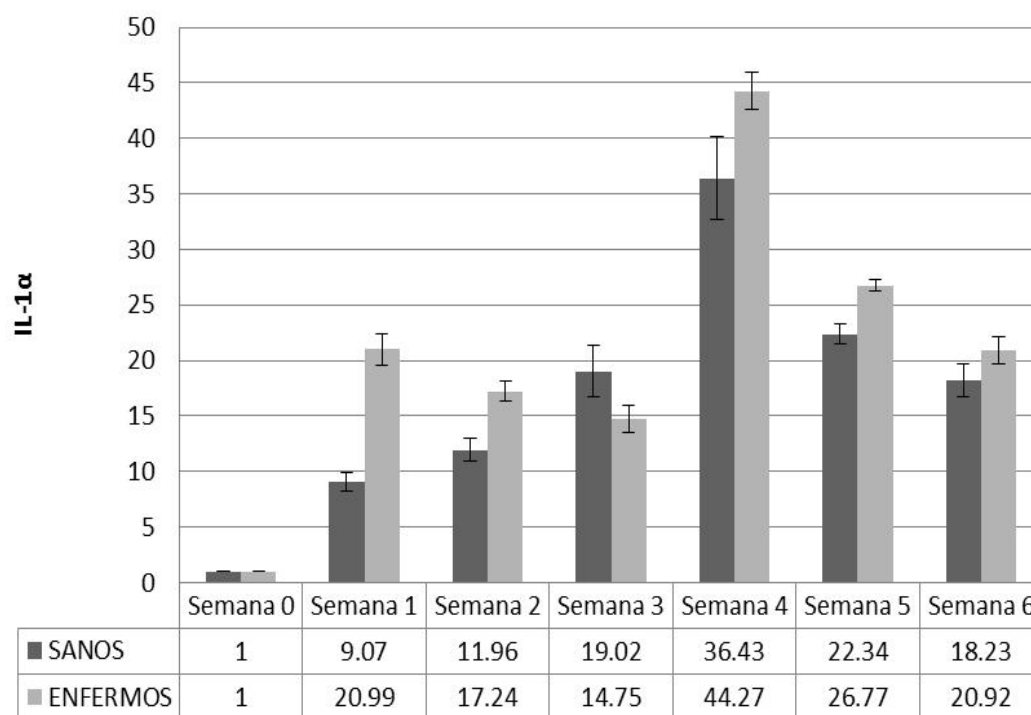


Figura 4. Niveles de expresión de IL-1 α en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y enfermas por semana de edad. Cada barra representa la media \pm DE por grupo etario. Hubo diferencia estadística ($p < 0.05$) al comparar animales sanos con enfermos en todos los grupos etarios

sexta semana podría relacionarse con el establecimiento progresivo de la nueva microflora y con procesos de supresión y tolerancia inmunológica a antígenos alimentarios (Mayer, 2003; Bertero, 2004).

Los resultados obtenidos en crías de alpaca enfermas muestran niveles de expresión relativa de TNF- α (Fig. 3) e IL-1 α (Fig. 4) con una tendencia decreciente en las primeras tres semanas de vida. Se tuvo un pico en la cuarta semana pero los valores disminuyeron en las dos últimas semanas (Figs. 3 y 4). Todos los grupos etarios consecutivos fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), excepto entre la segunda y tercera semana de edad para IL-1 α . Los niveles de expresión en animales enfermos no muestran una cinética similar a los sanos, no habiendo correlación estadística entre semana de edad y cantidad de citoquinas expresadas. Es probable que la cantidad de TNF- α e IL-1 α en animales con enteropatías esté asociada a la naturaleza de la infección (patógenos involucrados), tipo y severidad de lesiones entéricas ocasionadas y estadio de la enfermedad en lugar de relacionarse con la edad.

El presente estudio utilizó un diseño de caso-control, lo que significa que los casos (animales enfermos) se encontraban en curso en el momento de la determinación de los resultados, impidiendo saber si dichos individuos fueron examinados en la fase temprana o tardía de un proceso inflamatorio, lo cual repercutiría en el patrón de expresión de citoquinas (Kugathasan *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- Las crías de alpacas sanas (sin enteropatías) presentan una tendencia de expresión creciente para IL-1 α y TNF- α hasta la cuarta semana de edad, disminuyendo en la quinta y sexta semana de edad.
- La expresión de ambas citoquinas se incrementan en alpacas con enteropatía comparadas con las aparentemente sa-

nas, independientemente de la edad del animal.

Agradecimiento

Estudio financiado por el Fondo Nacional de Innovación en Ciencia y Tecnología (FYNCYT-PIBAP 2008) Contrato N.º 065-2008.

LITERATURA CITADA

1. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008.** Inmunología celular y molecular. 6ª ed. Madrid: Elsevier. 576 p.
2. **Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D. 1998.** IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 160: 403-409.
3. **Bertero I. 2004.** Alimentación complementaria y período de destete. Cátedra de Clínica Médica, Universidad de Córdoba. [Internet], [12 Julio 2011]. Disponible en: www.clinicapediatrica.fcm.unc.edu.ar
4. **Black D. 2003.** Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
5. **Castellanos R, Guevara M, Robinson R, Vázquez L. 2000.** Respuestas inmunes innata y adaptativa. *Medisan* 4(2): 64-74.
6. **Cid M, Martín C. 2010.** Diarreas neonatales en alpacas. En: Cid M (ed). *Sanidad de alpacas en la etapa neonatal*. Madrid: Ed Complutense. p 93-107.
7. **Denning TL, Campbell NA, Song F, Garofalo RP, Klimpel GR, Reyes VE, Ernst PB. 2000.** Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int Immunol* 12: 133-139.
8. **Fernández-Baca S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile: FAO. 362 p.
9. **Jergens A, Sonea I, O'Connor A, Kauffman L, Grozdanic S, Ackermann M, Evans R. 2009.** Intestinal

- cytokine mRNA expression in canine inflammatory bowel disease: A meta-analysis with critical appraisal. *Comp Med* 59: 153-162.
10. **Jones MA, Töttemeyer S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA. 2003.** Induction of proinflammatory responses in the human monocytic cell line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 71: 2626-2633.
 11. **Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L, Kou D, Itoh J, Binion DG, Levine AD, et al. 2007.** Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 1696-705.
 12. **Li C, Seth R, Gray T, Bayston R, Mahida Y, Wakelin D. 1998.** Production of proinflammatory cytokines and inflammatory mediators in human intestinal epithelial cells after invasion by *Trichinella spiralis*. *Infect Immun* 66: 2200-2206.
 13. **Linevsky JK, Pothoulakis C, Keates S, Warny M, Keates AC, Lamont JT, Kelly CP. 1997.** IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. *Am J Physiol* 273: 1333-1340.
 14. **Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.
 15. **Long K, Rosado J, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont H, Nanthakumar NN, Estrada-Garcia T. 2010.** Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infect Immun* 78: 1221-1228.
 16. **Lu Y, Sarson A, Gong J, Zhou H, Zhu W, Kang Z, Yu H, et al. 2009.** Expression profiles of genes in toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. *Clin Vaccine Immunol* 6: 1639-1647.
 17. **Mallona I. 2008.** Selección de genes de normalización para RT-PCR cuantitativa en *Petunia hybrida*. Tesis de Maestría. Cartagena: Univ Politécnica de Cartagena. 26 p.
 18. **Mayer L. 2003.** Mucosal immunity. *Pediatrics* 111: 1595-1600.
 19. **Odbileg R, Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2005.** Quantification of llama inflammatory cytokine mRNAs by real-time RT-PCR. *J Vet Med Sci* 67: 195-198.
 20. **Patil A, Hughes A, Zhang G. 2004.** Rapid evolution and diversification of mammalian α -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 20: 1-11.
 21. **Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
 22. **Pieper R, Janczyk P, Schumann R, Souffrant W. 2006.** The intestinal microflora of piglets around weaning with emphasis on lactobacilli. *Archiva Zootechnia* 9: 28-40.
 23. **Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998.** Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. *Pub Tec FMV* 34: 9-14.
 24. **Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL. 1997.** Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun* 65: 1631-1639.
 25. **Vinueza-Burgos C. 2009.** PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET*. [Internet], [15 febrero 2009]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209.htm>
 26. **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.
 27. **Williams D. 2001.** Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J Natl Cancer Inst Monogr* 29: 26-30.