

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**RESPUESTA INMUNO CELULAR CON LA  
ADMINISTRACIÓN DE FÓSFORO ORGÁNICO, ÁCIDO  
FÓLICO Y CIANOCOBALAMINA EN ALPACAS (*Vicugna  
pacos*)**

**TESIS**

PRESENTADO POR EL:

Bach. DALVERT DAVID COILA PACHECO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

Respuesta Inmuno Celular con la administración de fósforo orgánico,  
ácido fólico y cianocobalamina en alpacas (*Vicugna pacos*)

PRESENTADA POR:


Bach. DALVERT DAVID COILA PACHECO


PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

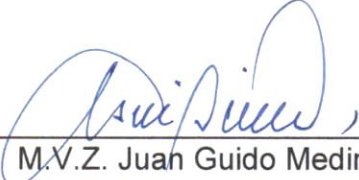


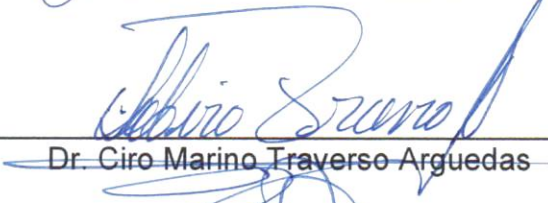
FECHA DE SUSTENTACIÓN: 30 DE OCTUBRE DEL 2017


APROBADA POR:


**PRESIDENTE** :   
Mg. Sc. Mario Rubén Zavaleta Gibaja

**PRIMER MIEMBRO** :   
Mg. Sc. Abigail Teresa De La Cruz Pérez

**SEGUNDO MIEMBRO** :   
M.V.Z. Juan Guido Medina Suca

**DIRECTOR DE TESIS** :   
Dr. Ciro Marino Traverso Arguedas

**ASESOR** :   
Mg. Sc. Uriel Santiago Marca Choque

**ASESOR** :   
M.V.Z. Alcides Edward Calle Pacompía

Área : Salud animal

Tema : Sistema inmune en alpacas

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....	7
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1.1. La Alpaca ( <i>Vicugna pacos</i> ).....	12
2.1.2. Consumo de alimento de la alpaca.....	14
2.1.3. Tejido Sanguíneo.....	15
2.1.4. Sistema inmune.....	16
2.1.5. Inmunidad.....	18
2.1.6. Inmunidad Innata.....	19
2.1.7. Inmunidad Adaptativa.....	20
2.1.7.1. Inmunidad Celular.....	21
2.1.7.2. Inmunidad Humoral.....	23
2.1.8. Leucocitos.....	25
2.1.8.1. Neutrófilos.....	25
2.1.8.2. Eosinófilos.....	26
2.1.8.3. Basófilos.....	28
2.1.8.4. Linfocitos.....	29
2.1.8.5. Monocitos.....	30
2.1.9. Fosforo Orgánico.....	31
2.1.10. Ácido Fólico.....	33
2.1.11. Cianocobalamina.....	36
2.1.12. Antecedentes.....	38
III. MATERIAL Y MÉTODOS .....	42
3.1. Lugar de estudio.....	42
3.2. Material experimental.....	42
3.2.1. Los animales.....	42
3.2.2. Fármacos.....	42

3.3. Análisis de laboratorio.....	43
3.4. Material.....	43
3.4.1. Fármaco utilizado.....	43
3.4.2. Material para administración del fármaco.....	44
3.4.3. Material para toma de muestra sanguínea.....	44
3.4.4. Material clínico.....	44
3.4.5. Otros.....	44
3.5. Metodología.....	45
3.5.1. Toma de muestra sanguínea.....	45
3.5.2. Trabajo en el laboratorio.....	46
3.6. Análisis estadístico.....	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1. Leucocitos.....	49
4.2. Linfocitos.....	54
4.3. Monocitos.....	58
4.4. Neutrófilos.....	60
4.5. Eosinófilos.....	63
4.6. Basófilos.....	65
V. CONCLUSIONES.....	68
VI. RECOMENDACIONES.....	69
VII. REFERENCIAS.....	70
VIII. ANEXOS.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Muestra el alcohol yodado, guantes de procedimiento, algodón y pintura en Sprite.....	84
Figura N° 2. Muestra las jeringas, catéteres, porta agujas vacutainer, tubos vacutainer y agujas vacutainer. ....	84
Figura N° 3. Muestra la caja de Tecnopor, termómetro, estetoscopio, balanza y ecografía utilizados.....	85
Figura N° 4. Muestra el momento donde se realizó la ecografía a las alpacas para asegurarse de que no se encuentran preñadas. ....	85
Figura N° 5. Muestra el procedimiento de toma de muestra de sangre de la vena yugular. ....	86
Figura N° 6. Muestra la caja de Tecnopor con las primeras muestras de sangre en los tubos vacutainer. ....	86
Figura N° 7. Muestra la primera toma de muestra de sangre de las alpacas en el lugar de pastoreo.....	87
Figura N° 8. Muestra el lugar donde se realiza la punción para la toma de muestra sanguínea.....	87
Figura N° 9. Muestra el momento en el que se esta tomando la muestra de sangre.....	87
Figura N° 10. Muestra el lugar de pastoreo donde se encontraban las alpacas en estudio.....	88
Figura N° 11. Muestra las alpacas en el corral donde se realizó la toma de muestras de sangre.....	88
Figura N° 12. Muestra la forma para sujetar a la alpaca para realizar una toma de muestra sanguínea sin mucha laceración.....	88
Figura N° 13. Muestra los 30 tubos vacutainer con las muestras sanguíneas..	89
Figura N° 14. Equipo de hematología Hemix 3-30 SFRI.....	89
Figura N° 15. Primer reactivo que se usa para el equipo Hemix 3-30 SFRI.....	89
Figura N° 16. Segundo reactivo que se usa para el equipo Hemix 3-30 SFRI..	90
Figura N° 17. Tercer reactivo que se usa para el equipo Hemix 3-30 SFRI.....	90
Figura N° 18. Equipo completo de hematología hemix 3-30 SFRI.....	90
Figura N° 19. Muestra el procedimiento antes de llevarlo al equipo de hematología hemix 3-30 SFRI .....	91
Figura N° 20. Muestra la forma de como el equipo toma una pequeña muestra de sangre para su análisis.....	91
Figura N° 21. Resultados que emite el equipo de hematología hemix 3-30 SFRI en su pantalla. ....	91
Figura N° 22. Resultado emitido por el equipo mencionado. ....	92
Figura N° 23. Solución turk.....	92
Figura N° 24. Laminas porta objetos con el coloreado mediante la técnica de portaobjetos en cuña para el conteo de los glóbulos blancos.....	92
Figura N° 25. Microscopio usado para para el conteo de los glóbulos blancos.	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Evaluación de tolerancia a Butafosfan, vitamina B9 y B12.....	39
Tabla N° 2. Valores Hematológicos promedio para el grupo de aplicación sub cutánea.....	40
Tabla N° 3. Valores hematológicos promedio para el grupo de aplicación intramuscular.....	40
Tabla N° 4. Valores hematológicos promedio para el grupo de aplicación intravenoso.....	40
Tabla N° 5. Valores hematológicos promedio para el grupo control.....	41
Tabla N° 6. Distribución de alpacas según la vía de administración.....	43
Tabla N° 7. Diseño del tratamiento y toma de muestra de sangre.....	43
Tabla N° 8. Valores leucocitarios en alpacas según vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	49
Tabla N° 9. Valores leucocitarios en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	52
Tabla N° 10. Valores de linfocitos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	54
Tabla N° 11. Valores de linfocitos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	56
Tabla N° 12. Valores de monocitos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	58
Tabla N° 13. Valores de monocitos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	59
Tabla N° 14. Valores de neutrófilos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	60
Tabla N° 15. Valores de neutrófilos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	62
Tabla N° 16. Valores de eosinófilos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	63
Tabla N° 17. Valores de eosinófilos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	64
Tabla N° 18. Valores de basófilos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	65
Tabla N° 19. Valores de basófilos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.....	66
Tabla N° 20. Registro de las alpacas del estudio realizado.....	77
Tabla N° 21. ANDEVA del DBCA (3x4) para Leucocitos.....	78
Tabla N° 22. Prueba de significancia de Tukey para leucocitos.....	78
Tabla N° 23. ANDEVA del DBCA (3x4) para Linfocitos.....	79
Tabla N° 24. Prueba de significancia de Tukey para linfocitos.....	79
Tabla N° 25. ANDEVA del DBCA (3x4) para Monocitos.....	80
Tabla N° 26. Prueba de significancia de Tukey para Monocitos.....	80
Tabla N° 27. ANDEVA del DBCA (3x4) para Neutrófilos.....	80
Tabla N° 28. Prueba de significancia de Tukey para Neutrófilos.....	81
Tabla N° 29. ANDEVA del DBCA (3x4) para Eosinófilos.....	81
Tabla N° 30. Prueba de significancia de Tukey para Eosinófilos.....	82
Tabla N° 31. ANDEVA del DBCA (3x4) para Basófilos.....	82
Tabla N° 32. Prueba de significancia de Tukey para Basófilos.....	83

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

ADN	: Ácido desoxirribonucleico.
ARN	: Ácido ribonucleico.
CD	: Cúmulo de diferenciación
CIP	: Centro de Investigación y Producción.
CSA	: Camélidos sudamericanos.
DBCA	: Diseño Bloque Completo al Azar.
IFN $\gamma$	: Interferón gamma.
Ig	: Inmunoglobulinas.
IL	: Interleucina.
INEI	: Instituto Nacional de Estadística e Informática.
MHC	: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
NK	: Natural Killer.
P	: Fósforo.
TNF	: Factor de Necrosis Tumoral.

## RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla donde se seleccionaron 30 alpacas hembras entre 3 a 5 años de edad aparentemente sanas, para la administración del fosforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina y evaluar la respuesta inmune celular, mediante la obtención de muestras sanguíneas. Las alpacas se dividieron en tres grupos de 10 cada uno, donde antes de administrar el fosforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina, se obtuvo la primera muestra de sangre siendo el control. La dosis administrada fue de 5 mL por animal, al primer grupo se administró por vía intramuscular, al segundo por vía subcutánea y al tercero por vía intravenosa, posteriormente se obtuvo muestras de sangre de las alpacas a los 3, 9 y 15 días post administración del fosforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina. Las muestras fueron evaluadas en el laboratorio MEDILAB, cuyos resultados fueron analizados con el Diseño Bloque Completo al Azar (DBCA) y la prueba de significancia de tukey, obteniéndose resultados significativos, cuyos promedios leucocitarios fueron de  $9475 \pm 312.22 \mu\text{L}$ ;  $12175 \pm 638.21 \mu\text{L}$ ;  $11275 \pm 454.54 \mu\text{L}$  y  $11833.33 \pm 377.86 \mu\text{L}$ , para el control, vía intramuscular, subcutánea e intravenosa respectivamente, con mayor respuesta inmune celular para la vía intramuscular, seguido de la vía intravenosa. Los valores leucocitarios fueron de  $9475 \pm 312.2 \mu\text{L}$ ;  $9775.33 \pm 295.38 \mu\text{L}$ ;  $12675 \pm 563.98 \mu\text{L}$  y  $12600 \pm 387.27 \mu\text{L}$ , que corresponde al control, día 3, 9 y 15 post administración respectivamente, encontrando mejor respuesta inmune celular para los días 9 y 15. Se obtuvo mejor respuesta inmune celular por la vía intramuscular y la respuesta inmune celular más óptima fue a los 9 días post administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

**Palabras clave:** Respuesta inmune celular, fosforo orgánico, ácido fólico, cianocobalamina, leucocitos.



## ABSTRACT

The research work was carried out at the Chuquibambilla Research and Production Center, where 30 female alpacas between 3 and 5 years of age apparently healthy were selected for the administration of organic phosphorus, folic acid and cyanocobalamin and to evaluate the cellular immune response by means of the obtaining blood samples. The alpacas were divided into three groups of 10 each, where before administering the organic phosphorus, folic acid and cyanocobalamin, the first blood sample was obtained being the control. The dose administered was 5 mL per animal, the first group was administered intramuscularly, the second was subcutaneously and the third was intravenously, afterwards blood samples were obtained from the alpacas at 3, 9 and 15 days after administration. of organic phosphorus, folic acid and cyanocobalamin. The samples were evaluated in the MEDILAB laboratory, whose results were analyzed with the Complete Randomized Block Design (DBCA) and the tukey significance test, obtaining significant results, whose leukocyte averages were  $9475 \pm 312.22 \mu\text{L}$ ;  $12175 \pm 638.21 \mu\text{L}$ ;  $11275 \pm 454.54 \mu\text{L}$  and  $11833.33 \pm 377.86 \mu\text{L}$ , for the control, intramuscular, subcutaneous and intravenous respectively, with greater cellular immune response for the intramuscular route, followed by the intravenous route. The leukocyte values were  $9475 \pm 312.2 \mu\text{L}$ ;  $9775.33 \pm 295.38 \mu\text{L}$ ;  $12675 \pm 563.98 \mu\text{L}$  and  $12600 \pm 387.27 \mu\text{L}$ , which corresponds to the control, day 3, 9 and 15 post administration respectively, finding better cellular immune response for days 9 and 15. The best cellular immune response was obtained by the intramuscular route and the response the most optimal cellular immune was 9 days after administration of organic phosphorus, folic acid and cyanocobalamin.

**Key words:** Cellular immune response, organic phosphorus, folic acid, cyanocobalamin, leukocytes.

## I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) constituyen un recurso de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y algunos países de la Región Andina. La crianza de los mismos es una actividad única e ideal para las condiciones de producción en las zonas altoandinas del Perú, siendo la crianza de alpacas en estos pisos ecológicos la de mayor importancia por su aporte en la producción de fibra, carne y piel. Sin embargo, el verdadero potencial productivo de esta especie no se expresa a cabalidad, pues se encuentra limitado por factores nutricionales, bajas tasas de natalidad y enfermedades que se traducen en altos índices de mortalidad neonatal (29.9% de un total de 41,569 crías durante los años 1982 – 1988) (Ameghino y DeMartini, 1991). La población de alpacas en el Perú es de 3'685,500. Observándose una mayor proporción para la raza Huacaya con 78.9% seguida por la raza Suri con 11.10% (INEI, 2013). 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 fósforo es un mineral que está presente en casi todos los alimentos por lo que su deficiencia sería algo extraño (Brandan *et al.*, 2012). En cambio, sí puede haber deficiencia de la vitamina B9 y B12 ocasionando severos daños en la síntesis de ADN, deficiencia en el metabolismo celular, división celular, crecimiento celular y un mal funcionamiento en la respuesta inmune (Herbert y Das, 1994; Lazarowski, 2015; Tizard, 2009).

Las alpacas sometidas a estudio fueron alimentadas con pastos naturales presentes en el lugar de pastoreo, además de que en toda crianza de animales están predispuestas a contraer diferentes enfermedades como infecciosas y/o parasitarias y queriendo mejorar la respuesta inmune en las alpacas con el uso complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas que demuestra el efecto de la respuesta inmune celular, el mismo que ha de contribuir al bienestar animal y la prevención de enfermedades para una mejor producción y productividad en esta especie animal.

Con los resultados se demuestra que se incrementa la respuesta inmune celular de las alpacas, utilizando el estimulante fosforo orgánico con vitaminas hematopoyéticas y además ayuda a mejorar la constitución del animal, manteniéndolos más activos y posiblemente disminuyendo la presentación de procesos infecciosos, de esta forma se contribuye a mejorar el sistema inmune mediante el uso de fármacos. Por tal motivo el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la respuesta inmune celular con la administración de fósforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina en alpacas hembras entre 3 a 5 años de edad, por diferentes vías de administración.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1. MARCO TEÓRICO

#### 2.1.1. La Alpaca (*Vicugna pacos*)

Las relaciones entre la alpaca y los demás camélidos sudamericanos han sido controvertidas durante muchos años. En los siglos XVIII y XIX, cuando recibieron nombres científicos, se creía que la alpaca era descendiente de la llama (*Lama glama*) y por ello fue denominada *Lama pacos*, ignorándose sus similitudes con la vicuña tanto en tamaño, como en la lana y la dentición. Su clasificación se complicó tras comprobarse que las cuatro especies de camélidos sudamericanos pueden cruzarse entre sí y dar descendencia fértil. Finalmente, mediante el uso de técnicas moleculares, Kadwell *et al.* (2001) demostraron que la alpaca y la vicuña se encuentran estrechamente relacionadas y que el nombre científico correcto es *Vicugna pacos*. Debido a que se detectó un porcentaje de ADN de llama en el de la alpaca, se concluyó que la alpaca es técnicamente un taxón híbrido intergenérico. De esta manera, rectificaron la taxonomía de los camélidos sudamericanos a dos géneros *Lama* y *Vicugna*, cada uno con un animal silvestre y un doméstico: *Lama guanicoe* (el guanaco silvestre y ancestral) y *Lama glama* (la llama doméstica descendiente del guanaco), *Vicugna vicugna* (la vicuña silvestre y ancestral) y *Vicugna pacos* (la alpaca doméstica descendiente de la vicuña). Subsecuentemente, esta propuesta ha

sido aceptada por los especialistas en taxonomía de animales domésticos (Gentry *et al.*, 2004).

Clasificación taxonómica de la alpaca.

Reino: animal.

Filo: Cordado

Clase: mamífero

Orden: Artiodactila.

Familia: Camelidae.

Género: Vicugna.

Especie: *Vicugna pacos*.

(Gentry *et al.*, 2004).

En el mismo año, Wheeler *et al.* (2001) demostraron la existencia de cuatro agrupaciones genéticamente y geográficamente distintas de vicuñas en el país. Sin embargo, en el 2007 se confirmó la división subespecífica de la vicuña en *Vicugna vicugna vicugna* (distribución correspondiente al llamado “diagonal seco” desde aproximadamente 20°S en la cordillera oeste y 25°S en la cordillera este en su extensión norteña y 26°S en la cordillera oeste y 29°S en la cordillera este en su extensión sureña) y *Vicugna vicugna mensalis* (con distribución al norte del “diagonal seco” hasta aproximadamente 8°S). Esta publicación se caracteriza por el gran número y amplia distribución de las muestras estudiadas (en total 423), en contraste con los estudios de Norambuena y Paredes (2003) que llegaron a la conclusión de que solamente existe una subespecie de vicuña: *Vicugna vicugna*.

El Perú tiene más de cuatro millones de alpacas (*Vicugna pacos*) y es el primer productor de esta especie en el mundo. La alpaca, desde su domesticación en los Andes centrales, hace 7000 años, cumple un rol importante en la economía rural, pues más de 250 000 comunidades campesinas localizadas por encima de los 3800 msnm dependen de la crianza de la alpaca como su principal o única fuente de ingresos. Estudios arqueológicos han demostrado la ocurrencia de alta mortalidad neonatal durante el proceso de domesticación y, al parecer, este problema sigue vigente, limitando seriamente la adecuada explotación de la alpaca en ambientes climáticos extremos como los Andes peruanos (Wheeler, 1995).

### **2.1.2. Consumo de alimento de la alpaca**

El nivel de consumo de alimento expresado en kg de materia seca por día, es de 1.8% de peso vivo en llamas y del 2 % en alpacas y 2.3 % en ovinos, lo que expresado en relación al peso metabólico de los camélidos sería entre 35 a 38 gramos de materia seca por kg ( $P^{0.75}$ ), observándose que existe mayor consumo de materia seca en época de estiaje, por la capacidad de los camélidos sudamericanos de incrementar su capacidad gástrica en respuesta al consumo de pastos de baja calidad. Esto indica que las alpacas y llamas consumen en promedio un 30 % menos de materia seca que el ovino para un mismo peso metabólico, lo que puede variar entre 36 % bajo pasturas cultivadas y en 26 % en pasturas nativas. La ingesta de las

alpacas siempre está más compuesta de hojas en más del 90 % antes de tallos y flores (San Martín, 1991).

### **2.1.3. Tejido Sanguíneo.**

La sangre se encuentra en el interior de los vasos sanguíneos y del corazón y circula por todo el organismo impulsada por las contracciones del corazón y por los movimientos corporales. Entre sus principales funciones está la de transportar nutrientes y oxígeno desde el aparato digestivo y los pulmones, respectivamente, al resto de las células del organismo. También se encarga de llevar productos de desecho desde las células hasta el riñón y los pulmones y de mantener homogéneamente la temperatura corporal. Entre las células que forman la sangre están las del sistema inmunitario, que utiliza la red de vasos sanguíneos para viajar a cualquier parte del organismo y defendernos frente a las enfermedades. La sangre es considerada por numerosos autores como un tipo especializado de tejido conectivo compuesto de células, fragmentos celulares y una matriz extracelular líquida denominado plasma sanguíneo (Molist y Ponbal, 2014).

La sangre aporta a las células agua, electrolitos, nutrientes y hormonas, además elimina los productos de desecho, aportan oxígeno (glóbulos rojos), protege el organismo de sustancias extrañas y de los antígenos (glóbulos blancos) e inician la coagulación (plaquetas) debido a la diversidad funcional del sistema

hemolinfático sus enfermedades se puede examinar mejor desde una perspectiva funcional que se puede clasificar como respuestas normales a situaciones anormales por ejemplo; leucocitos y desviación a la izquierda en respuesta a la inflamación o anomalías primarias del sistema hematopoyético, pancitopenia por aplasia medular (Rhone, 2002).

#### **2.1.4. Sistema inmune.**

El sistema inmune es la responsable de limitar el acceso de estos microorganismos a los tejidos del huésped. Así, la respuesta inmune comprende una serie de mecanismos sucesivos y dependientes unos de otros que se inician luego de la invasión del patógeno. Estos eventos 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, mientras que 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).

La respuesta inmune que se monta frente a una infección frente a antígenos intracelulares, como son los agentes virales o bacterias intracelulares, es dirigido por la subpoblación de linfocitos Th1, debido a que los anticuerpos de la vía humoral resultan ineficaces cuando el patógeno encuentra una forma de evadirla al interior de las



células. Así, la principal citoquina de esta vía de respuesta inmune es el Interferón gamma (IFN  $\gamma$ ), este fue el primer agente involucrado en la respuesta antiviral, y se ha demostrado que permite la activación y estimulación de los macrófagos, incrementando su actividad microbicida, inclusive puede promover la expresión de moléculas de MHC tipo II e induce la secreción de IL 12 la cual permite la estimulación de linfocitos Th1 (Wakil *et al.*, 1998).

La mayoría de los conocimientos sobre inmunidad parte de años de experiencia en vacunación intramuscular exitosa, lo que nos ha brindado un panorama bastante claro de cómo actúa el sistema inmune ante una infección dentro del organismo. Los mecanismos de resistencia (inflamación, complemento, fagocitosis) trabajan de manera coordinada con el sistema inmune para detectar, confinar, destruir, eliminar y reparar el daño causado por microorganismos, parásitos y células propias aberrantes, y lo hace a través de una inmunidad que genera memoria. En contraste con lo que ocurre dentro de nuestro organismo (por ejemplo, en el bazo, el hígado o el riñón, donde es intolerable la presencia de agentes extraños o células transformadas), en las mucosas, por ser una interfase entre el interior y el exterior del cuerpo, normalmente se encuentran grandes cantidades de moléculas extrañas y microorganismos. Así, el sistema inmune de las mucosas debe inducir: una respuesta especializada que genere tolerancia o no reacción contra las moléculas benéficas, una respuesta inmune no esterilizante para la flora normal y una

inmunidad esterilizante contra los patógenos. Esta triple función determina las diferencias principales entre el sistema inmune interno y el de las mucosas, por lo que las funciones principales del sistema inmune de las mucosas son la inducción de tolerancia, la adaptación al medio y a la protección (Vega, 2007).

#### **2.1.5. Inmunidad.**

Todos los organismos vivos se encuentran expuestos a agentes patógenos en el medio ambiente, lo que implica que deben contrarrestar estos efectos a través de mecanismos de defensa sofisticados. La respuesta inmune es el principal mecanismo de defensa, el cual requiere un alto grado de organización dentro de los componentes celulares que la dirigen.

Las citoquinas son las que se encargan de establecer un estrecho grado de comunicación y organización entre las células que forman la respuesta inmune humoral y celular (More, 2010).

El sistema inmunitario es complejo y los elementos que lo integran participan en numerosas funciones de forma integrada con otros sistemas del organismo. En la protección frente a agentes extraños (bacterias, virus, parásitos, hongos, levaduras, pólenes, proteínas alimentarias, toxinas, células cancerígenas, etc.) una primera línea de defensa la constituyen las barreras físicas y químicas, como son la piel y las mucosas (nasal, intestinal, etc.), sus secreciones (pH ácido del estómago, lisozima, y otros componentes antibacterianos

del sudor y otras secreciones) y la flora autóctona protectora. Una vez que los patógenos han atravesado esta primera barrera, el sistema inmunitario pone en marcha mecanismos de defensa activa que se pueden dividir en dos categorías: respuesta inmune innata o inespecífica y respuesta inmune adaptativa o específica (también llamada inmunidad adquirida) (Ferguson y Griffin, 2000).

#### **2.1.6. Inmunidad Innata.**

Se conoce a la respuesta inmunitaria innata como la primera línea de defensa del huésped frente a los microorganismos. Este sistema lleva ese nombre debido a que sus mecanismos efectores existe aun antes de que aparezca la noxa (Brandan *et al.*, 2007).

Las barreras físicas como la piel, pueden excluir a muchos microorganismos, sin embargo, los animales también necesitan un sistema de defensa reactivo. Esto es, deben ser capaces de movilizar sus defensas y enfocarlas o concentrarlas en sitios donde se desarrolla la invasión microbiana. Lo ideal es que cualquier organismo invasor que logre entrar en los tejidos sea atrapado y atacado pronto, para que no pueda escapar y se le destruya rápidamente. De ello se encargan células capaces de fijar, ingerir y destruir sustancias extrañas mediante un proceso llamado fagocitosis. Las células fagocíticas de los mamíferos pertenecen a dos sistemas complementarios. Uno de ellos llamado sistema mieloide, que está formado por celular que actúan pronto pero que

son incapaces de mantener su esfuerzo sostenido, el segundo sistema de los fagocitos mononucleares, está formado por células que actúan con más lentitud, pero son capaces de fagocitosis repetidas (Tizard, 2002).

El mecanismo que lleva adelante la inmunidad innata, es la inflamación, este es un complejo proceso el cual existe un aumento de la permeabilidad capilar y migración de los leucocitos, desde la sangre hacia la zona afectada. Esto se logra a través de cambios estructurales en los capilares sanguíneos que permite el paso de los leucocitos desde la sangre al tejido. Además, el reclutamiento celular se lleva a cabo por las citoquinas, especialmente el TNF y las quimioquinas, encargadas de actuar y guiar a los fagocitos hacia la zona afectada. Durante las primeras fases de inflamación son los neutrófilos los que actúan, luego acuden los macrófagos y finalmente los linfocitos (Brandan *et al.*, 2007).

#### **2.1.7. Inmunidad Adaptativa.**

Es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado, que es estimulada luego de la exposición a agentes infecciosos y cuya capacidad e intensidad defensiva aumenta después de cada exposición subsiguiente y un determinado microorganismo. Existen dos tipos de inmunidad adaptativa, la inmunidad celular y la inmunidad humoral, ambas actúan en conjunto con el fin de eliminar a los microorganismos. Las principales características de la

respuesta adaptativa son: Diversidad, que es lo que permite a sistema inmunitario responder a una gran variedad de antígenos extraños; especificidad, que da lugar a que cada microorganismo genere respuestas específicas en su contra; memoria, donde la exposición del sistema inmunitario a un agente extraño mejora su capacidad para responder de nuevo a este; especialización, que genera respuestas óptimas para la defensa frente a los microorganismos; autolimitación, que permite al sistema inmunitario disminuir de intensidad frente a un antígeno a medida que este va siendo eliminado; ausencia de autorreactividad, que es una de las propiedades más importantes del sistema inmune, que brinda la capacidad de reconocer lo propio de lo extraño y no reaccionar frente a las sustancias antigénicas propias (Brandan *et al.*, 2007).

#### **2.1.7.1. Inmunidad Celular.**

La inmunidad celular recibe este nombre debido a que sus mediadores son células a diferencia de la inmunidad humoral, cuyos mediadores son moléculas. Las células T o linfocitos T son los principales efectores de la inmunidad celular, estos se encargan básicamente de erradicar a los microorganismos intracelulares (Brandan *et al.*, 2007).

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. Las células específicas que median este tipo de respuesta son los linfocitos T CD8, también llamados linfocitos T citotóxicos (Goldsby et al., 2002).

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., 2003).

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).

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 II de la familia de los interferones, que desencadenan una respuesta inmune mediada por células. El IFN- $\gamma$

umenta la defensa contra patógenos bacteriales y virales, y es producido por las células NK, células T CD4+ y T CD8+, 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 (Carter y Murphy, 1999; Schroder et al., 2004).

#### **2.1.7.2. Inmunidad Humoral.**

Recibe este nombre debido a que sus mediadores con los anticuerpos y las proteínas del complemento. Los anticuerpos de utilidad para la defensa del huésped se encuentran en la sangre, pero son producidos por los linfocitos B o las células plasmáticas en los ganglios linfáticos, incluso muchos anticuerpos pueden proceder de antiguas células de memoria. El sistema del complemento es otro de los grandes efectores de la inmunidad humoral (Brandan *et al.*, 2007).

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).



### **2.1.8. Leucocitos.**

Los leucocitos se originan en la médula ósea, pero algunos de ellos como los linfocitos, adquieren su capacidad funcional en el parénquima del bazo, del timo, ganglios linfáticos, amígdalas y folículos linfáticos situados en el aparato digestivo, respiratorio y urogenital.

Los leucocitos son atraídos a los tejidos mediante una serie de sustancias químicas (quimiotaxis) elaboradas por los agentes bacterianos o virales que producen infección o sustancias liberadas por las células y tejidos afectados. La vida media de los leucocitos es de algunas horas hasta 9 a 10 días aproximadamente (Getty, 2005).

#### **2.1.8.1. Neutrófilos.**

La principal función es la defensa del organismo contra las infecciones mediante el fenómeno de la fagocitosis. En el lugar de la infección, los neutrófilos atraviesan las paredes de los capilares sanguíneos, atraídos por un factor quimiotáctico producido en la zona afectada, y llegan al líquido intersticial, emiten pseudópodos y fagocitan a la bacteria para destruirla mediante las sustancias que contienen en su interior los gránulos específicos e inespecíficos (Corrons, 2006).

Como respuesta a la infección, los neutrófilos pasan de la sangre a la zona afectada y engloban bacterias y restos de tejidos. Al mismo tiempo la médula ósea es estimulada para liberar más neutrófilos a

la circulación dando lugar a una leucocitosis caracterizado por un aumento de las formas jóvenes, se considera que los neutrófilos son la primera línea de defensa y la duración de su vida en la corriente sanguínea es de unos 5 días (Dellman, 1980).

Los valores normales de neutrófilos en algunas especies domesticas son: vacas 33%, ovinos 40.46%, vicuñas 51.16%, alpacas 52.3% (Vallenas, 1969).

#### **2.1.8.2. Eosinófilos.**

El eosinófilo es un granulocito pequeño derivado de la médula ósea, tiene una vida media en la circulación de 6 a 12 horas antes de migrar a los tejidos en donde permanece por varios días, su desarrollo en la médula ósea es estimulado por interleucina-5, interleucina 3 y factor estimulante de colonias granulocito-macrófago. Su núcleo bilobulado es característico y sus gránulos citoplásmicos son distintivos, estas proteínas granulares son responsables de muchas funciones proinflamatorias, principalmente en la patogénesis de las enfermedades alérgicas, como célula efectora de hipersensibilidad inmediata, así como en la muerte de parásitos. Los eosinófilos interactúan con otras células por la expresión de múltiples receptores en su superficie (Brito y col., 2003).

No se conoce totalmente la función exacta del eosinófilo, se sabe que los eosinófilos aumentan en un número en los animales intensamente parasitarios e infiltran los puntos de reacción alérgica, recientes experimentos indican que los eosinófilos son atraídos a la zona en las que reacciona anticuerpos y antígenos y fagocitan los complejos antígeno-anticuerpo (Dellman, 1980).

Los eosinófilos emigran de la médula ósea bajo la influencia de IL-5 producida por los linfocitos Th2 y mastocitos. Así, los linfocitos Th2 movilizan eosinófilos al mismo tiempo que estimulan reacciones de IgE. Los eosinófilos expresan tanto anticuerpo como receptores de complemento (CD32, CD23, CD16, CD35), y el número de estos receptores aumenta cuando los eosinófilos son activados, la movilización y activación de eosinófilos favorece su capacidad de matar o dañar parásitos (Tizard, 2002).

Los eosinófilos pueden matar eficazmente a los helmintos más que otros leucocitos, porque la proteína básica principal de los gránulos de los eosinófilos puede ser más tóxica para los helmintos que las enzimas proteolíticas producidas por neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, se ha establecido en infecciones por helmintos la función ineludible de la Ig E y de los eosinófilos en la resistencia de animales *in vivo*. La habilidad de los eosinófilos para matar una variedad de parásitos *in vitro*, incluyendo larvas del nemátodo *Trichinella spiralis*,

indican que los eosinófilos son células antiparasitarias efectoras (Claerebout y Vercruysse, 2000).

### **2.1.8.3. Basófilos.**

Los basófilos pueden contribuir a proteger contra helmintos y garrapatas, además de tener un rol durante la inflamación alérgica crónica mediada por IgE en la piel y estar implicados en la respuesta de fase tardía del asma alérgico (Valdivia, 2012).

Estudios ultra estructurales de los basófilos no han aclarado mucho la función de este tipo de célula. Histoquímicamente, los gránulos son similares a la de las células cebadas y también son metacromáticos. Como consecuencia de estas semejanzas se creyó que estas células cebadas eran en realidad basófilos tisulares. Sin embargo datos más recientes indican que no son tan estrechamente similares. No se ha determinado la función exacta de los basófilos, parecieran reaccionar a los estados alérgicos y de estrés de manera parecida de a como lo hacen los eosinófilos (Dellman, 1980).

Ciertamente, diferentes estudios han mostrado que los basófilos podrían tener interacciones de corta duración con los linfocitos dentro de ganglios linfáticos potenciando la polarización hacia la respuesta TH2 con una liberación rápida de IL-4 durante infecciones por helmintos y frente a algunos antígenos proalérgicos (Valdivia, 2012).

#### 2.1.8.4. Linfocitos.

Después de los neutrófilos, los linfocitos son los leucocitos más numerosos en la circulación. En números absolutos se encuentran de 1,000 a 3,000 por mm<sup>3</sup> de sangre y en números relativos entre 20 y 30 por ciento de la cuenta total. El 75% de los que circulan son T y el mayor número de ellos corresponde a los T de ayuda (Th, CD4); el 25% restante corresponde a los linfocitos B y NK. Los linfocitos se originan en la médula ósea y derivan de la célula madre hematopoyética CD 34 (stem cell). La maduración de los linfocitos B se realiza en el hígado fetal antes del nacimiento y después en la médula ósea; los T maduran en el timo. En estos órganos, los linfocitos son seleccionados mediante un riguroso escrutinio, por lo que de las células generadas inicialmente, emerge sólo una minoría: 50% de B y 10% de T aproximadamente, el resto muere por apoptosis (Vega, 2009).

Cuando una noxa ingresa, la respuesta inmune mediada por estas células se desarrollará en tres fases: Reconocimiento: unión de antígenos extraños a receptores específicos de linfocitos maduros. Activación: proliferación, expansión clonal y diferenciación hacia células efectoras. Requiere de la participación de dos señales, el antígeno y células colaboradoras, con participación de moléculas coestimuladoras. Fase efectora: se desarrollan las funciones que llevan a la eliminación del antígeno (Brandan *et al.*, 2005).

La respuesta inmune que se monta frente a una infección frente a antígenos intracelulares, como son los agentes virales o bacterias intracelulares, es dirigido por la subpoblación de linfocitos Th1, debido a que los anticuerpos de la vía humoral resultan ineficaces cuando el patógeno encuentra una forma de evadirla al interior de las células. Así, la principal citoquina de esta vía de respuesta inmune es el Interferón gamma (IFN –  $\gamma$ ), este fue el primer agente involucrado en la respuesta antiviral, y se ha demostrado que permite la activación y estimulación de los macrófagos, incrementando su actividad microbicida, inclusive puede promover la expresión de moléculas de MHC tipo II e induce la secreción de IL 12 la cual permite la estimulación de linfocitos Th1 (Wakil *et al.*, 1998).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\gamma$ ), participa en la respuesta inmune celular a través de la estimulación linfoide Th1, lo mismo que la IL 12, siendo potentes inductores de la respuesta inmune celular (Costa- Pereira *et al.*, 2002).

#### **2.1.8.5. Monocitos.**

Son células sanguíneas de mayor tamaño; de 15-20 micras de diámetro, tienen un núcleo con red cromática fina y delgada de forma variable, redondo con pequeñas escotaduras, intensamente lobulado o en una herradura. Su citoplasma, de color gris azulado es

ancho y está repleto de un polvo de granulaciones azurófilas en algunas se aprecian vacuolas en la periferie (Guerci, 1988).

Los monocitos como los linfocitos y los neutrófilos fagocitan activamente, pero al igual que los linfocitos, no contienen peroxidasas, ellos invaden las áreas de inflamación poco después de los neutrófilos y por fagocitosis activa, contribuyen a eliminar las bacterias (Ganong, 1988).

Los monocitos son células maduras precursoras de los macrófagos, es decir, una vez que el monocito es activado, este manifiesta cambios morfológicos que lo adaptan para sus nuevas funciones como macrófagos (Brandan *et al.*, 2007).

#### **2.1.9. Fosforo Orgánico.**

El fósforo (P) es un mineral esencial para el metabolismo del organismo animal donde juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas. Es un componente del ATP y los ácidos nucleicos y forma parte de los fosfolípidos que integran y dan flexibilidad a las membranas celulares. En los alimentos de origen animal predomina el P inorgánico que se encuentra en forma de ortofosfatos en solución en el medio celular y mayoritariamente como fosfatos de calcio en los tejidos óseos y en la leche. Alrededor del 80-85% del P presente en el organismo animal se localiza en el esqueleto como fosfato cálcico

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y el 15-20% restante se encuentra como P orgánico en los tejidos muscular y nervioso y, especialmente en los glóbulos rojos. La sangre contiene entre 35 y 45 mg de P/100 ml localizado en su mayor parte en el interior de las células ya que la fracción plasmática sólo posee entre 4,5 y 6 mg P/100 ml en adultos y entre 6 y 9 mg P/100 ml en animales jóvenes (McDowell, 1992).

Es el segundo mineral más abundante en el organismo. Aproximadamente un 85% se encuentra combinado con el calcio en huesos y dientes, interviniendo, por tanto, en su adecuada mineralización. El fósforo forma parte de todas las células y es constituyente del material genético (ADN y ARN), de algunos hidratos de carbono, lípidos (fosfolípidos que ayudan a transportar otros lípidos en la sangre) y proteínas (fosfoproteínas, como la caseína de la leche). Es necesario para la activación de muchos enzimas y de las vitaminas del grupo B y participa en el metabolismo energético (Carbajal, 2013).

Dada la amplia distribución del P en los alimentos, es difícil que en condiciones normales exista déficit de origen alimentario. La concentración normal de P en sangre oscila entre 2,5 a 5,6 mg/dl en los adultos y es algo superior en los niños. Las determinaciones de P en el extracelular pueden no reflejar con precisión la disponibilidad de fosfato dentro de las células. El 85% del fósforo corporal se



encuentra en el esqueleto mientras que el 15% restante se distribuye en los tejidos blandos. El fosfato plasmático, que interviene en casi todos los procesos metabólicos, se compone también de tres fracciones: unido a proteínas (12%), ionizado (55%) y formando complejos (35%). La absorción del fósforo de la dieta por el intestino es bastante eficaz (70-80% de lo ingerido). Se elimina por el riñón (que es el órgano que ejerce sobre el fósforo un control más importante) y sufre reabsorción tubular proximal, que es variable (50-90%), y no existen pruebas de que en el túbulo distal sea secretado. La cantidad de fosfato eliminada en la orina depende de la dieta. Si la sobrecarga de fósforo disminuye, aumenta la reabsorción tubular proximal y disminuye la fosfaturia; si la cantidad de fósforo que llega al riñón aumenta, ocurrirá lo contrario. La PTH favorece la eliminación de fosfato en la orina (Brandan *et al.*, 2012).

La absorción del fósforo ocurre principalmente en el intestino delgado. El fósforo absorbido puede ser retenido o secretado, ya sea para funciones productivas (por ejemplo en la leche) o secretado en el lumen del intestino para reabsorción o para ser excretados en las heces (NRC, 2001).

#### **2.1.10. Ácido Fólico.**

La vitamina B9, también llamada folato, es una de las vitaminas B hidrosolubles. El nombre proviene de 'folium', que es la palabra latina para hoja, porque los folatos se aislaron por primera vez de las hojas

de la espinaca. La vitamina B9 se da en diferentes formas: la natural que es el folato y el ácido fólico, que es un compuesto de folatos sintético utilizado en suplementos vitamínicos y alimentos enriquecidos por ser más estable. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que presta asesoramiento científico a los responsables políticos, ha confirmado que se han demostrado unos claros beneficios para la salud de la ingesta de folato (vitamina B9) en la dieta, ya que contribuye a lo siguiente: Formación normal de células sanguíneas; Nivel normal de homocisteína; Funcionamiento normal del metabolismo del sistema inmunitario; División celular normal (Helbert and Das, 1994).

El ácido fólico es un nutriente esencial para la vida celular por lo que su deficiencia da lugar al desarrollo de patologías. El trastorno más frecuente que se produce como consecuencia de una deficiencia de ácido fólico es la anemia macrocítica y megaloblástica, cuya sintomatología clínica es muy parecida a la de la anemia inducida por deficiencia de vitamina B12. Si se instaura de forma crónica, además de signos hematológicos, aparecen signos generales y neuropsiquiátricos. Entre los signos generales, cabe destacar la astenia y la anorexia, que van apareciendo de forma progresiva (Alpers y col., 1990).

Ácido Fólico es el término más utilizado para referirse a una familia de vitámeros de actividad biológica relacionada. Es una sustancia

amarilla, cristalina, que pertenece al grupo de los compuestos conocidos como pterinos. La función principal de este grupo de compuestos es actuar como coenzima en el transporte de fragmentos simples de carbono. El ácido tetrahidrofólico es un portador de formil de carbón único, hidroximetilo o grupos metilo. Tiene una acción importante en la síntesis de las purinas, guanina y adenina y de la pirimidina timina, que son compuestos que se utilizan para la formación de nucleoproteínas: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), que son esenciales para la división celular. El folato es esencial para la formación de eritrocitos y leucocitos en la médula y en su maduración, por la acción que tiene como transportador de carbono único en la formación del grupo heme. Su deficiencia es causa de anemia megaloblástica y otros trastornos hematológicos (principalmente en recién nacidos) (Suarez, 2003).

El ácido fólico (folatos o folacina) tiene diversas funciones, pero es especialmente importante en la formación de las células sanguíneas y del ADN en las células en fase de división rápida, por lo que sus necesidades se incrementan durante las primeras semanas de la gestación (Carbajal, 2013).

El ácido fólico y la piridoxina son esenciales, para el normal metabolismo intracelular, se comprende que la deficiencia de alguna de estas vitaminas ocasione severas alteraciones en la respuesta inmune. La carencia de ácido fólico o vitamina B10 suprime la

respuesta de algunos linfocitos, lo que a su vez se acompaña de una disminución de anticuerpos. Las deficiencias de biotina, ácido pantoténico y ácido fólico alteran la respuesta de la inmunidad humoral (Valverde, 2006).

#### **2.1.11. Cianocobalamina.**

El término cobalamina se refiere a una familia de compuestos con una estructura determinada. La vitamina B12 es una cobalamina (PM 1,355) que resulta de la unión asimétrica de 4 anillos pirrólicos, formando un grupo macrocíclico casi planar (núcleo corrina) en torno a un átomo central de cobalto (Co). El anillo corrina es parecido al anillo porfirínico y se diferencia de éste por el carácter asimétrico de las uniones entre los grupos pirrólicos. En esta estructura, el Co posee 6 valencias de coordinación, 4 de las cuales establecen enlace covalente con los correspondientes nitrógenos (N) de los anillos pirrólicos. La quinta valencia de coordinación se halla siempre unida a un seudonucleótido complejo, el 5,6 dimetilbencimidazol, casi perpendicular al núcleo y la sexta valencia al unirse a diferentes radicales origina los diversos derivados de la cobalamina (Forrellat y col., 1997).

Los requerimientos mínimos diarios de vitamina B12 oscilan alrededor de los 2 µg, cantidad completamente cubierta por una alimentación mixta normal que contenga entre 5 y 30 µg de cobalamina, de los que se absorben de 1 a 5 µg. El requerimiento

mínimo es la cantidad de vitamina que cubre las necesidades provocadas por las pérdidas diarias de ésta, que se producen fundamentalmente por la orina, las heces y las descamaciones cutáneas y que son de 0,1 %/día (1,3 µg) (Vives, 1988).

Se ha demostrado que la vitamina B12 juega un papel central en los procesos inmunes, porque regula la división celular y el crecimiento. Cuando la suplementación de esta vitamina no es adecuada, las células blancas de la sangre no pueden madurar y multiplicarse, esto desencadena una disminución de la respuesta de las células de la sangre y de la contracción del órgano crítico del sistema inmunológico, el timo (Tizard, 2009).

Las deficiencias de tiamina o B1, roboflavina o B2, ácido pantoténico o B5, biotina o B8 y cianocobalamina o B12, pueden disminuir la producción de anticuerpos (Valverde, 2006).

La deficiencia de moderada de vitamina B12 también es común entre la población de edad avanzada, posiblemente debido a cambios en el epitelio gástrico, que provoca la incapacidad de absorber eficazmente la vitamina B12, esto genera una enfermedad grave caracterizada por anemia megaloblástica y/o trastornos neurológicos, ocasionando deterioro irreversible y finalmente con la muerte. El organismo no es capaz de sintetizar las múltiples diferentes cobalaminas lo cual es dependiente de su adquisición diaria en la dieta, de esta forma la

ingesta y la absorción a nivel ileal resulta el paso limitante para el aporte de la vitamina B12 a todas las células del organismo (Lazarowski, 2015).

#### **2.1.12. Antecedentes.**

Veinticinco (25) alpacas del departamento de Junín, las cuales se encontraban con signos de inapetencia, debilitamiento o mala condición física fueron tratadas con una solución inyectable sobre la base de Butafosfan, vitamina B9 y B12 como estimulante del metabolismo. El tratamiento consistió en una dosis de 2.5 mL por animal, vía intramuscular. La respuesta posterior al tratamiento con Butafosfan, vitamina B9 y B12 demostró la alta influencia de estos en la recuperación del apetito y funciones metabólicas, a las 24 horas de aplicada una dosis única. Así mismo, hubo una tolerancia del 100 % de los animales, ya que no hubo ninguna reacción toxica, ya sea de tipo local o sistémico (Tang y Ruiz, 2006).

Tabla N° 1. Evaluación de tolerancia a Butafosfan, vitamina B9 y B12.

ARETE	DOSIS (mL)	Vía	Reacción de tipo anafiláctica	Reacción en punto de inoculación (Minuto 10)	Reacción en punto de inoculación (Minuto 20)	Reacción en punto de inoculación (Minuto 30)
145	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
533	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
117	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
363	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
311	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
593	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
199	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
683	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
171	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
309	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
005	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
127	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
051	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
s/n	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
095	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
081	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
336	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
257	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
335	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
339	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
739	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
243	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
238	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
0517	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
153	2.5 mL	I.M.	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

(Tang y Ruiz, 2006)

Con bovinos de engorde con aparente estado de anemia, 03 grupos de 10 animales cada uno, fueron administrados con Fósforo Orgánico, Ácido Fólico y Cianocobalamina por las 03 diferentes vías de administración (vía subcutánea, intramuscular y endovenosa) y un grupo control. Fueron tratados con una dosis única recomendada entre 10 a 25 mL por animal. La respuesta posterior al Fósforo Orgánico, Ácido Fólico y Cianocobalamina fue un fuerte efecto inmunoestimulante, mayormente

en la fracción de neutrófilos, la mejor opción es la vía intramuscular por sus mejores resultados y asimismo posee excelente tolerancia por las vías aplicadas, porque no poseen ningún tipo de reacción indeseable tanto a nivel sistémico como en el punto de aplicación (Li y Alvarado, 2007).

Tabla N° 2. Valores Hematológicos promedio para el grupo de aplicación sub cutánea.

MUESTREO	Hb (g/dl)	Ht (%)	GR (x 106/ul)	GB (x ul)	Neu %	Linf %	Eos %	Bas %	Mon %
PRE.TTO	9.1	30.4	6.35	13350	22.4	75.8	1	0.4	0.4
24 Hrs	9.48	32.6	7.44	13760	25.8	72	2	0.2	0
POST.TTO									
06 DÍAS POST.TTO	9.04	33.2	7.49	13070	29.4	69.8	1.4	0.2	0.2

(Li y Alvarado, 2007)

Tabla N° 3. Valores hematológicos promedio para el grupo de aplicación intramuscular.

MUESTREO	Hb (g/dl)	Ht (%)	GR (x 106/ul)	GB (x ul)	Neu %	Linf %	Eos %	Bas %	Mon %
PRE.TTO	10.08	33.4	7.07	10990	29.6	68.4	1.6	0.2	0.2
24 Hrs	10.38	34	7.92	11720	34.6	62.8	2.2	0.2	0.2
POST.TTO									
06 DÍAS POST.TTO	9.25	36.2	8.30	11280	36.2	61.6	1.8	0.2	0.2

(Li y Alvarado, 2007)

Tabla N° 4. Valores hematológicos promedio para el grupo de aplicación intravenoso.

MUESTREO	Hb (g/dl)	Ht (%)	GR (x 106/ul)	GB (x ul)	Neu %	Linf %	Eos %	Bas %	Mon %
PRE.TTO	9.625	32	6.57	11750	33	64.5	2	0	0.5
24 Hrs	10.18	33.4	7.58	12506	36.2	64.2	2	0	0.6
POST.TTO									
06 DÍAS POST.TTO	10	32.5	7.74	10025	32.75	65.75	1.5	0	0

(Li y Alvarado, 2007)



Tabla N° 5. Valores hematológicos promedio para el grupo control.

MUESTREO	Hb (g/dl)	Ht (%)	GR (x 10 <sup>6</sup> /ul)	GB (x ul)	Neu %	Linf %	Eos %	Bas %	Mon %
PRE.TTO	10.22	33.8	6.91	15170	39.4	58.2	1.8	0.6	0
24 Hrs POST.TTO	10.14	33.4	6.84	15270	39.4	58.4	1.6	0.4	0.2
06 DÍAS POST.TTO	9.78	32.8	6.18	14530	38.4	59	1.8	0	0.2

(Li y Alvarado, 2007)

Por otra parte, en vacas lecheras, la deficiencia de cobalamina (B12) (causada por la deficiencia de cobalto) afecta la función de los neutrófilos y la resistencia a la infección parasitaria. En terneras, los neutrófilos aislados a partir de terneras deficientes en vitamina B12 habían reducido la capacidad de matar a hongos del tipo *Candida albicans* (Waldron, 2013).

Un estudio realizado en barbos, la adición de ácido fólico en la dieta disminuyó significativamente la mortalidad cuando los peces fueron infectados experimentalmente con *Edwardsiella ictaluri* y, a mayores concentraciones de ácido ascórbico, el ácido fólico produjo mayor síntesis de anticuerpos (Duncan y Lovell, 1993).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

El lugar de estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano Puno. Que se encuentra en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar, departamento de Puno, a una altitud de 3915msnm. Su ubicación geográfica corresponde entre las coordenadas latitud sur de 14°47'5.2''S; longitud oeste de 70°42'56.5''W (SENAMHI, 2015).

#### 3.2. Material experimental

##### 3.2.1. Los animales.

Se utilizó treinta alpacas hembras adultas que no estaban preñadas entre las edades de 3 a 5 años, diez alpacas para la administración intramuscular, diez para la administración subcutánea y diez para la administración intravenosa.

##### 3.2.2. Fármacos.

Se utilizó el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina en una dosis única de 5 mL por animal, administrándolo según la vía correspondiente por grupo.

Tabla N° 6. Distribución de alpacas según la vía de administración.

VÍA DE ADMINISTRACION	NUMERO DE ALPACAS HEMBRAS	DOSIS en mL por animal del fármaco.
INTRAMUSCULAR	10	5
SUBCUTANEO	10	5
INTRAVENOSA	10	5
TOTAL	30	

Tabla N° 7. Diseño del tratamiento y toma de muestra de sangre.

Tiempo toma de muestra	Vía Intramuscular	Vía Intravenosa	Vía Subcutáneo
Pre-administración	1 <sup>a</sup> toma de muestra	1 <sup>a</sup> toma de muestra	1 <sup>a</sup> toma de muestra
A los 3 días post administración	2 <sup>a</sup> toma de muestra	2 <sup>a</sup> toma de muestra	2 <sup>a</sup> toma de muestra
A los 9 días post administración	3 <sup>a</sup> toma de muestra	3 <sup>a</sup> toma de muestra	3 <sup>a</sup> toma de muestra
A los 15 días post administración	4 <sup>a</sup> toma de muestra	4 <sup>a</sup> toma de muestra	4 <sup>a</sup> toma de muestra

### 3.3. Análisis de laboratorio.

Las muestras se remitieron al laboratorio MEDILAB, que se encuentra ubicado en la ciudad de Puno, en el jirón Lima número 188 tercer piso, donde se realizó un hemograma a cada muestra.

### 3.4. Material.

#### 3.4.1. Fármaco utilizado.

- Fósforo Orgánico 500 mg.

- Ácido Fólico 45 mg.
- Cianocobalamina 0.25 mg.

#### **3.4.2. Material para administración del fármaco.**

- Jeringas de 10 mL con agujas hipodérmicas de calibre N° 20 Gx1.
- Guantes de procedimiento.
- Algodón.
- Alcohol yodado.

#### **3.4.3. Material para toma de muestra sanguínea.**

- Tubos vacutainer de 3 mL con EDTA.
- Agujas vacutainer.
- Porta agujas vacutainer.
- Jeringas descartables de 10 mL con agujas hipodérmicas de calibre N° 20 Gx1.
- Caja de tecnopor para transportar las muestras.
- Gradillas.

#### **3.4.4. Material clínico.**

- Termómetro.
- Estetoscopio.

#### **3.4.5. Otros.**

- Cuaderno de apuntes y lapicero.
- Guantes de diagnóstico.

- Sogas.
- Marcador indeleble.
- Laptop.

### 3.5. Metodología.

#### 3.5.1. Toma de muestra sanguínea.

Previo a la toma de muestra se realizó una evaluación, tomando las constantes clínicas como: Frecuencia cardiaca, temperatura y se seleccionó a los animales clínicamente sanos y la determinación de la edad fue registrada por medio del arete que llevan en la oreja las alpacas; cuando se obtuvieron las primeras muestras de sangre se procedió a realizar la administración del Fósforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina en dosis única de 5 mL (fósforo orgánico 500mg, ácido fólico 45mg y cianocobalamina 0.25mg) por las vías de administración mencionadas.

La muestra de sangre fue tomada de la vena yugular bajo el siguiente procedimiento:

- Se sujeta adecuadamente a la alpaca para luego proceder a tomar la muestra de la manera menos traumática y lo más rápido posible, donde el sitio de punción fue desinfectado.
- Luego se procedió a tomar la muestra de sangre con la ayuda de la aguja vacutainer y su porta aguja vacutainer en donde la punción debe ser en un ángulo de 45° aproximadamente con respecto al cuello del animal, después se introdujo por el otro extremo de la aguja el tubo vacutainer con EDTA para la

extracción de la sangre de forma directa al tubo y se homogenizó la muestra con el anticoagulante.

- Se rotuló el tubo con la fecha y número respectivo para luego remitirlo al laboratorio.

### **3.5.2. Trabajo en el laboratorio.**

Las muestras en el laboratorio fueron evaluadas por el Equipo de hematología Hemix 3-30 SFRI en el que consiste de la siguiente manera:

- Primero el tubo vacutainer con la muestra de sangre bien homogenizada, se llevó hacia un tubo delgado que tiene el equipo de hematología Hemix 3-30 SFRI, el cual toma la muestra necesaria de sangre para su evaluación.
- Se presionó el botón de inicio y el equipo de hematología se encarga de absorber una muestra de sangre de 80 uL y comienza a evaluarlo, el cual no demora más de 2 minutos.
- Una vez terminado la evaluación en la pantalla del equipo de hematología se pudo observar los resultados de la muestra que indica: Hemoglobina, hematocrito, hematíes, leucocitos, linfocitos, VCM, HCM.

Para la determinación de los leucocitos como neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos se realizó la técnica del portaobjetos en cuña cuyo procedimiento es el siguiente:

- Se colocó una gota de sangre anti coagulada con EDTA en un extremo de un portaobjetos, donde el tamaño de la gota fue como el tamaño de sangre obtenida por punción de un dedo.
- Luego con otro portaobjetos fue sostenido de manera segura por delante de la gota de sangre en un ángulo de 35° a 45° con respecto al otro portaobjetos para realizar el extendido de la muestra.
- El portaobjetos extensor se deslizó a hacia atrás hasta que tome contacto con la gota de sangre y se sostiene en esa posición hasta que la sangre se esparza por todo el ancho del portaobjetos.
- A continuación, el extensor se deslizó con rapidez y suavidad hacia el otro extremo del portaobjetos que sirve de soporte del extendido, con lo que se crea un frotis de cuña.
- En el microscopio se evaluó la porción más clara del extendido cabe decir que es la última parte del extendido ya que en ese lugar las células se pudieron observar con mayor facilidad, y el conteo de los leucocitos se realizó en un numero de 100 células para sacar el porcentaje adecuado.

### **3.6. Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se realizó un diseño bloque completo al azar bajo un arreglo factorial de 3x3 (3 vías de administración y 4 toma de muestras de sangre) donde se puede estudiar los efectos individuales y el efecto de interacción de los factores.

El modelo matemático fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Resultado esperado final.

$\mu$  = Es el promedio

$\alpha_i$  = Es el efecto de la vía de administración.

$\beta_j$  = Es el efecto del tiempo en el que se toma las muestras sanguíneas.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Es la interacción entre la vía de administración y el tiempo de la toma de muestras sanguíneas.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error de la muestra que no puede ser manejado.

$i = 1, 2, \dots, a$      $j = 1, 2, \dots, b$      $k = 1, 2, \dots, n$

Se utilizó la prueba de significancia de Tukey, cuando se encontró diferencia estadística significativa.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Leucocitos.

Tabla N° 8. Valores leucocitarios en alpacas según vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	Promedio μL.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
SIN DROGA	9475,0000	1710,11611	312,22306	5800,00	12800,00
INTRA MUSCULAR	12175,0000	3495,66604	638,21838	7200,00	20500,00
SUB CUTANEO	11275,0000	2489,64753	454,54537	7400,00	17200,00
INTRA VENOSO	11833,3333	2069,62224	377,85960	7200,00	15000,00
Total	11000,0000	2793,91442	255,04833	5800,00	20500,00

En la tabla N° 8 muestra los valores leucocitarios obtenidos de las alpacas en estudio, que fueron analizados con el Diseño Bloque Completo al Azar (DBCA) obteniéndose diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y se analizó con la prueba de significancia de tukey. Los valores mostraron que la vía intramuscular obtuvo los mejores resultados, en segundo lugar, la vía intravenosa y por último la vía subcutánea, todos estos resultados fueron mayores con respecto a los resultados obtenidos en el control.

La absorción de vitamina B12 y su posterior distribución en el cuerpo esta mediada por un complejo de proteínas transportadores llamadas factor intrínseco, transcobalamina II y haptocorrina llamada también proteína R, que translocan la vitamina B12 del exterior celular al citoplasma y finalmente al exterior celular. Este complejo sistema permite describir la ruta que la vitamina B12 transita desde los alimentos hasta llegar a las diferentes células del cuerpo. (Lazarowski, 2015).

Cuando el complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas fueron administradas por vía intramuscular, estos se difundieron entre las fibras musculares, con lo cual la absorción fué rápida debido a la alta vascularización que tiene este tejido (Míguez y Muñoz, 2009). Sin embargo, para que la vitamina B12 pueda pasar hacia el torrente sanguíneo su salida debe ser mediante el transporte activo ejercido por la proteína de resistencia a múltiples fármacos conocido como MRP-1, en cambio la vitamina B9 pasa al torrente sanguíneo cuando es reducido de poliglutamato a dihidrofolato y tetrahidrofolato (Forrellat y du Defaix, 1997). La vitamina B12 en el torrente sanguíneo se une a la transcobalamina II con quien es transportado hacia las células que requieren de esta vitamina, como los hepatocitos; la vitamina B9 acompaña a la vitamina B12 en el torrente sanguíneo de forma libre y solo una porción se une a la proteína sérica como la albumina. Además, estas vitaminas hematopoyéticas según Valverde (2006), son primordiales para la síntesis de ADN, síntesis de proteínas, división celular, para el normal metabolismo intracelular, lo que una deficiencia ocasiona severas alteraciones en la respuesta inmune celular. Comprobando así que la administración por vía intramuscular del complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas resultó con mayor respuesta inmune celular en comparación a las otras vías, debido a que la vía intravenosa no se da el mecanismo de absorción como ocurre en otras vías, lo que ocasiona que la concentración de las vitaminas administrada sea el 100% y su acción como estimulante de la respuesta inmune celular que es el objeto de nuestro estudio sea de

manera más rápida que la vía intramuscular tal como lo indica Míguez y Muños (2009), y con respecto a la vía subcutánea que resulto tener la menor respuesta inmune celular, debido a que su absorción es de forma lenta, ya que es una zona que tiene poca vascularización, esta absorción lenta pudo haber sido el factor de nuestros resultados ya que la vitaminas B12 y B9 son eliminadas por la orina, tal como lo indica Forrellat y du Defaix (1997), este mecanismo pudo haber causado que la concentración del complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas no haya alcanzado los mismo que en la vía intramuscular y la vía intravenosa.

Li y Alvarado (2007), en vacunos obtuvieron resultados similares indicando que la mejor respuesta inmune celular fue a los 6 días, por la vía intramuscular con respecto a la vía subcutánea, intravenosa y a su control, también indicaron que a las 24 horas la mejor respuesta fue de la vía intravenosa, en las alpacas en estudio, muestra tener mejor respuesta inmune por la vía intramuscular que probablemente se deba a la especie animal y la altitud en la que viven estos animales.

Tizard (2002), indica que las deficiencias de vitamina A, Cianocobalamina y ácido fólico deprimen las inmunorreacciones mediadas por células; estando de acuerdo con la efectividad de la respuesta inmune celular, con los resultados obtenidos mediante el uso del estimulante fosforo orgánico con vitaminas hematopoyéticas administradas en la alpaca, se tuvo muy buena respuesta en la

administración intramuscular, que la consideramos la mejor vía para elevar la respuesta inmune en las alpacas.

Por otra parte, Lazarowski (2015), indica que en ausencia de limitaciones dietarias en el aporte nutricional de la vitamina B12, su deficiencia será principalmente consecuencia de la destrucción autoinmune de las células parietales gástricas, lo que genera la anemia perniciosa clásica. Esta aclaración ayuda a confirmar la importancia que tiene la vitamina B12 con respecto al sistema inmunitario, habiéndose incrementado en el recuento de glóbulos blancos, siendo el más efectivo la administración por vía intramuscular, sin desmerecer las demás vía, que también incrementaron en las alpacas a las que se sometieron a investigación.

Tabla N° 9. Valores leucocitarios en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

Tiempo de toma de muestras.	Promedio. $\mu$ L	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
TESTIGO	9475,0000	1710,11611	312,22306	5800,00	12800,00
3 DIAS	9775,0000	1617,90005	295,38678	7200,00	12700,00
9 DIAS	12675,0000	3089,06163	563,98291	7200,00	20500,00
15 DIAS	12600,0000	2121,17133	387,27113	10000,00	17200,00
Total	11000,0000	2793,91442	255,04833	5800,00	20500,00

En la tabla N° 9 muestra los valores leucocitarios obtenidos según el tiempo, estos valores fueron analizados con el DBCA, donde se encontró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y se analizó con la prueba de significancia de tukey. Los valores mostraron que a los 9 días se obtuvo

la mejor respuesta inmune celular, seguido por los resultados a los 15 días y con menores valores o menor respuesta inmune celular a los 3 días.

Según Tang y Ruiz (2006), reportaron una mejoría en 25 alpacas con inapetencia, debilitamiento y mala condición física al día siguiente de su administración de fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina, concordando con estos autores, que el complejo administrado en las alpacas sometidas a estudio realmente tiene un efecto de incremento de la inmunidad celular y por ende probablemente la humoral, puesto que los resultados obtenidos se incrementan más a los 9 días, demostrando de esta forma que las vitaminas B9 y la B12, influye en respuesta hematopoyética a nivel de la medula ósea (Brandan *et al.*, 2007).

La administración de fosforo orgánico, con vitaminas hematopoyéticas realizado por Li y Alvarado (2007), reportaron en vacunos haber obtenido una respuesta inmune de tipo celular a las 24 horas post administración y al sexto día de su investigación, en el que mencionan que la vía intravenosa tiene mayor respuesta a las 24 horas bajando después a los 6 días, en cambio a los 6 días tuvieron mejores respuestas en las vía intramuscular y subcutánea, siendo mejor la vía intramuscular, con respecto a nuestro trabajo se obtuvo mejores resultados al noveno día y fueron disminuyendo al décimo quinto día, a diferencia que Li y Alvarado (2007), solo hicieron sus análisis hasta el sexto día, por lo que nos permite presumir que si ellos hubieran

realizado más días de investigación hubieran encontrado resultados similares a los que se obtuvo en este trabajo.

Duncan y Lovell (1993), realizaron un estudio en barbos, donde confirmaron que la adición de ácido fólico en su dieta hizo disminuir significativamente la mortalidad de estos peces, cuando fueron infectados experimentalmente con *Edwardsiella ictaluri* y, a mayores concentraciones de ácido ascórbico, el ácido fólico produjo mayor síntesis de anticuerpo; de este estudio se desprende que el ácido fólico incrementa la respuesta inmune celular, tal como se obtuvo en las alpacas que se sometieron a estudio con la combinación de fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas, teniendo mejor respuesta inmune celular al noveno día.

#### 4.2. Linfocitos.

Tabla N° 10. Valores de linfocitos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	Promedio %	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
SIN DROGA	32,0000	9,63733	1,75953	12,00	52,00
INTRA MUSCULAR	37,4000	6,94510	1,26800	22,00	54,00
SUB CUTANEO	37,5000	9,02621	1,64795	22,00	58,00
INTRA VENOSO	37,5000	7,08860	1,29420	26,00	52,00
Total	36,7857	8,32107	,75961	12,00	58,00

En la tabla N° 10 muestra los valores de los linfocitos que fueron analizados estadísticamente, no se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ), por lo que estadísticamente todos los resultados

son similares. Numéricamente la vía intravenoso y subcutáneo tienen valores iguales, la vía intramuscular tiene un valor ligeramente menor, pero todos tuvieron valores mayores a los del control.

La razón de estos resultados es debido a que cuando el complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas fueron administradas por las distintas vías en las alpacas en estudio y absorbidas hacia el torrente sanguíneo, uno de los lugares donde llegan a localizarse es en la médula ósea y en el timo, tanto la vitamina B12 y B9 tal como lo indica Forrellat y du Defaix (1997) y Lazarowski (2015), estimulando una mejor producción de células sanguíneas en la médula ósea y en el timo incrementa la producción de linfocitos T, dando lugar a una mejor protección celular al organismo del animal, esto se demuestra con los resultados obtenidos de acuerdo a la vía de administración.

En los estudios realizados por Li y Alvarado (2007), indicaron haber obtenido una ligera baja de los linfocitos cuando el complejo fosforo orgánico y las vitaminas hematopoyéticas fueron administradas por vía intramuscular y subcutánea, en cambio cuando se administraron por vía intravenoso se mantuvieron los valores de linfocito, sin que se muestre diferencia significativa, con respecto a la vía de administración, similar hecho se presentó en las alpacas sometidas a estudio, donde la vía intramuscular tuvo menor respuesta inmune celular frente a la intravenosa y subcutánea, sin embargo las tres vías de administración mostraron incremento de linfocitos referente al control, de esto se

deduce que el fármaco administrado influye en la respuesta celular de los linfocitos.

More (2010), indica que la respuesta inmune humoral, es una respuesta eminentemente de linfocitos Th2, que permite la activación y diferenciación eosinofílica, estimula la diferenciación de linfocitos B y promueve la producción de grandes cantidades de IgM, IgE e IgG, con ello afirmamos que al aplicar el complejo fosforo organico y vitaminas hematopoyéticas en las alpacas produce respuesta inmune celular y dentro de ello también se da una respuesta inmune humoral, ya que todo empieza de la acción de los linfocitos.

Tabla N° 11. Valores de linfocitos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

TIEMPO DE TOMA DE MUESTRAS	Promedio %	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
TESTIGO	32,0000	9,63733	1,75953	12,00	52,00
3 DIAS	38,2857	8,11101	1,48086	22,00	58,00
9 DIAS	34,0000	6,37848	1,16455	22,00	49,00
15 DIAS	40,3333	7,15421	1,30617	24,00	57,00
Total	36,7857	8,32107	0,75961	12,00	58,00

La tabla N°11 muestra los valores de linfocitos según el tiempo, que fueron analizados estadísticamente, donde se encontró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), por lo que luego se corroboró con una prueba de significancia de Tukey y se encontró que el valor máximo se obtuvo en el día 15, en segundo lugar al día 3 y en tercer lugar al día 9,



estos resultados comparados con el día del control son superiores, confirmando que existe un considerable aumento en la respuesta inmune hasta el día 15.

En el estudio realizado en vacunos por Li y Alvarado (2007) indican que no hay una diferencia significativa del recuento de linfocitos durante el tiempo de estudio, ya sean intramuscular, subcutáneo, intravenoso y el control al administrar el complejo de fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas, a diferencia que en las alpacas, los linfocitos muestran el mayor incremento a los 15 días, que se debe a que la activación de las células Th1 que resulta de la secreción de citoquinas, que activan macrófagos y coordinan con la respuesta inmune mediada por células, donde las vitaminas hematopoyéticas estarían influenciando para que se presente respuesta linfocitaria (Janeway et al., 2003).

Por otra parte, Costa-Pereira *et al.* (2002), indica que el factor de necrosis tumoral alfa participa en la respuesta inmune celular a través de la estimulación linfoide Th1, lo mismo que la IL 12, siendo potentes inductores de la respuesta inmune celular, estando de acuerdo, que con la administración del complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas en las alpacas en estudio, incrementa la respuesta inmune celular, ya que los linfocitos empiezan con la reacción del factor de necrosis tumoral alfa; asimismo Leach et al. (1999), indica que las células Th2 permiten la estimulación de altos títulos de anticuerpos, así como las IL-4, 5 y 10. La IL-5 es una citoquina hematopoyética que

estimula la producción de eosinófilos por la médula ósea, así como la activación y quimiotaxis de eosinófilos y basófilos, es probable que esta respuesta humoral se haya dado en las alpacas en estudio, ya que la mejor respuesta linfocitaria se da a los 15 días post administración del complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas.

#### 4.3. Monocitos.

Tabla N° 12. Valores de monocitos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	Promedio %.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
SIN DROGA	0,4286	0,73108	0,13348	0,00	3,00
INTRA MUSCULAR	0,2963	0,85836	0,15671	0,00	3,00
SUB CUTANEO	0,2143	0,58329	0,10649	0,00	2,00
INTRA VENOSO	0,3214	0,61495	0,11227	0,00	2,00
Total	0,3153	0,70169	0,06406	0,00	3,00

La tabla N° 12 muestra los valores de los monocitos que fueron analizados estadísticamente, donde no se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ). Esto indica que la vía de administración no tiene un efecto directo en los monocitos administrando fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina en la alpaca.

Las funciones de los monocitos son activos cuando hay inflamación o daño de tejidos, dirigiéndose hacia el lugar afectado, donde fagocitan activamente al igual que lo hacen los linfocitos y neutrófilos tal como lo indica Ganong (1988), por tal razón en la investigación realizada no hubo incremento considerable de monocitos ya que las alpacas sometidas a

estudio estaban aparentemente sanas y no presentaban ningún síntoma de procesos inflamatorios o daños físicos considerables.

Comparando los resultados del estudio con Li y Alvarado (2007), obtuvieron los mismos resultados donde no encontraron variación en el conteo de los monocitos, lo que indica que la vía de administración no influye en cuanto a la monocitosis, puesto que los monocitos al ser activados manifiestan cambios morfológicos que la adaptan para sus nuevas funciones como son los macrófagos (Brandan *et al.*, 2007).

Tabla N° 13. Valores de monocitos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

TIEMPO	Promedio %	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
TESTIGO	0,4286	0,73108	0,13348	0,00	3,00
3 DIAS	0,4231	0,89763	0,16388	0,00	3,00
9 DIAS	0,2500	0,59596	0,10881	0,00	2,00
15 DIAS	0,1724	0,48423	0,08841	0,00	2,00
Total	0,3153	0,70169	0,06406	0,00	3,00

En la tabla N° 13 muestra los valores de monocitos según el tiempo, que fueron analizados estadísticamente, donde se encontró diferencia estadística, por lo que luego se corroboró con la prueba de significancia de tukey y se encontró que en los datos del día 3 fue el mayor y el control como segundo lugar, en los días 9 y 15 se obtuvieron menores valores.

Los monocitos son células maduras precursoras de los macrófagos y cuando estos monocitos son activados, manifiesta cambios morfológicos para adaptarse a sus nuevas funciones como macrófagos (Brandan *et al.*, 2007), por lo que nos hace pensar, que debido a esta función es que se encontró menor cantidad de monocitos en los días 9 y 15 en las alpacas en estudio, que al administrar el complejo fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas hace que se presente respuesta celular en los linfocitos, ya que los monocitos por más complejo que se administre no muestra respuesta celular y que no presenta ningún factor de activación para su cambio de función, es probable que al administrar el complejo en estimulación de monocitos (enfermedades infecciosas) tenga respuesta celular.

#### 4.4. Neutrófilos.

Tabla N° 14. Valores de neutrófilos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	Promedio %.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
SIN DROGA	65,0000	10,15535	1,85410	44,00	87,00
INTRA MUSCULAR	58,7500	6,90827	1,26127	43,00	77,00
SUB CUTANEO	61,6667	9,10602	1,66252	40,00	75,00
INTRA VENOSO	61,0000	7,03064	1,28361	47,00	72,00
Total	61,0000	8,44995	,77137	40,00	87,00

La tabla N° 14 muestra los valores de los neutrófilos que fueron analizados estadísticamente, donde se encontró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y corroborando con la prueba de significancia de Tukey se observó que el valor más alto estuvo en el control, luego la vía

subcutánea, intravenoso e intramuscular sucesivamente. Esto hace pensar que el hecho de que los neutrófilos hayan disminuido según la vía de administración, es debido a que en nuestro estudio hubo una buena respuesta inmune celular con los linfocitos y que por un acto de equilibrio a nivel de leucocitos es que el conteo de neutrófilos haya estado disminuyendo, la explicación es que existe un conteo limitado de linfocitos en animales sanos, no ocurriendo así en animales que tienen algún proceso infeccioso, donde el conteo de leucocitos incrementa más de los valores fisiológicos normales.

Referente a la administración del complejo fosforo orgánico y las vitaminas hematopoyéticas Li y Alvarado (2007), reportaron haber encontrado mejores resultados por la vía intramuscular y subcutáneo hasta los 6 días de su evaluación, esto realizado en bovinos de engorde con una posible afectación de anemia, a diferencia del presente estudio que se trabajó con alpacas aparentemente sanas, en la que se deduce que la respuesta de los neutrófilos al complejo administrado no muestra incremento alguno frente al testigo, esto se debe a que los neutrófilos muestran respuesta neutrofilica frente a procesos infecciosos, siendo estas de primera línea de defensa y duración de su vida, estando de acuerdo con lo que manifiesta Dellman (1980).

Tabla N° 15. Valores de neutrófilos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

TIEMPO	Promedio %.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
TESTIGO	65,0000	10,15535	1,85410	44,00	87,00
3 DIAS	60,0000	8,17453	1,49246	40,00	75,00
9 DIAS	63,7500	6,74196	1,23091	49,00	77,00
15 DIAS	57,7500	7,13652	1,30294	40,00	73,00
Total	61,0000	8,44995	,77137	40,00	87,00

La tabla N° 15 muestra los valores de neutrófilos que corresponde al tiempo, estos datos fueron analizados con el DBCA donde se encontró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), y se analizó con la prueba de significancia de tukey, mostrando que en el día 9 tiene los valores más altos con respecto a los otros días y el valor más bajo se obtuvo en el día 15, esto nos indica que hasta el día 9 se tuvo mejor respuesta inmune celular en los neutrófilos y de ahí fue bajando poco a poco.

Referente al tiempo de administración del complejo, Li y Alvarado (2007) indican obtener mejor respuesta inmune celular a los 6 días post administración del fosforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina, ya que su estudio solo duro ese tiempo, y nos hace predecir que si hubieran realizado más tiempo su estudio, sus resultados serían probablemente similares a nuestro trabajo, pero sin embargo en el presente estudio el recuento de neutrófilos no supero al grupo testigo, esto se debe a que después de la administración del complejo no se mostró estimulación para que se presente neutrofilia, tal es caso de procesos infecciosos, es asi que Waldron (2013) realizaron sus estudios en terneras con

deficiencia de vitamina B12, aislando los neutrófilos y evaluándolos, obtuvo que su capacidad de eliminar a hongos del tipo *Candida albicans* había reducido, lo que nos hace confirmar de que la vitamina B12 realmente influye en la respuesta inmune y los neutrófilos son activados en presencia de procesos infecciosos y es probable que los neutrófilos tengan capacidad adaptativa que actúan a fin de eliminar microorganismo (Brandan *et al.*, 2007), y estas células muestran características de autolimitación.

#### 4.5. Eosinófilos.

Tabla N° 16. Valores de eosinófilos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

VIA DE ADMINISTRACIÓN	Promedio %.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
SIN DROGA	0,8571	1,97717	0,36098	0,00	6,00
INTRA MUSCULAR	0,5833	1,77596	0,32424	0,00	6,00
SUB CUTANEO	0,3077	0,81720	0,14920	0,00	3,00
INTRA VENOSO	0,6667	1,60495	0,29302	0,00	6,00
Total	0,5895	1,63623	0,14937	0,00	6,00

La tabla N° 16 muestra los valores de los eosinófilos que fueron analizados estadísticamente, donde se encontró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y se analizó con la prueba de significancia de tukey, obteniendo que el control tuvo el resultado más alto, seguidos del intramuscular, intravenoso y subcutáneo sucesivamente.

Los eosinófilos incrementan su actividad de expresar anticuerpos y receptores de complemento cuando son activados, esto favoreciendo su

capacidad de matar o dañar parásitos (Tizard, 2002), que en los resultados del presente estudio, la vía intramuscular, intravenoso y subcutáneo muestra recuentos celulares bajos referente al control, es debido a que en las alpacas al momento del control, posiblemente hayan estado con un grado de parasitosis y luego fue disminuyendo por el sistema de autolimitación (Brandan *et al.*, 2007).

Tabla N° 17. Valores de eosinófilos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

TIEMPO	Promedio %	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
TESTIGO	0,8571	1,97717	0,36098	0,00	6,00
3 DIAS	0,3462	1,24522	0,22735	0,00	4,00
9 DIAS	0,7727	1,80676	0,32987	0,00	6,00
15 DIAS	0,4615	1,26355	0,23069	0,00	6,00
Total	0,5895	1,63623	00,14937	0,00	6,00

La tabla N° 17 muestra los valores de los eosinófilos con respecto al tiempo, donde fueron analizados estadísticamente, encontrándose una diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y corroborando con la prueba de Tukey se encontró que el valor máximo lo tuvo el control con respecto a los días 3, 9 y 15.

Una de las principales características de la respuesta adaptativa es la autolimitación, que le permite al sistema inmunitario celular disminuir de intensidad frente a un antígeno a medida que este va siendo eliminado (Brandan *et al.*, 2007), de esto se deduce que la disminución de los resultados con respecto al control, fue que los eosinófilos actúan con la



presencia de parásitos y/o alergias, y en las alpacas en estudio, conforme pasaba el tiempo fue eliminando a los parásitos, lo que ocasionó que disminuyera también el número de eosinófilos en la circulación sanguínea, es así que Claerebout y Vercruyssen (2000), indican que la habilidad de los eosinófilos para matar una variedad de parásitos *in vitro*, incluyendo larvas del nematodo *Trichinella spiralis*, manifiesta que los eosinófilos son células antiparasitarias efectoras, y según los resultados de la investigación, es probable que los eosinófilos manifiesten una respuesta de autolimitación.

#### 4.6. Basófilos.

Tabla N° 18. Valores de basófilos en alpacas según la vía de administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

VÍA DE ADMINISTRACIÓN	Promedio %.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
SIN DROGA	0,6087	1,30604	0,23845	0,00	6,00
INTRA MUSCULAR	1,0556	1,16511	0,21272	0,00	5,00
SUB CUTANEO	0,4615	0,73030	0,13333	0,00	2,00
INTRA VENOSO	0,5385	0,80872	0,14765	0,00	3,00
Total	0,6458	1,05307	0,09613	0,00	6,00

La tabla N° 18 muestra los valores de los basófilos que fueron analizados estadísticamente, donde hubo diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y llevándolo a la prueba de significancia de tukey, se obtuvo que la vía intramuscular es la que tiene mayores resultados con respecto a las otras dos vías y al control.

Según Valdivia (2012), indica que los basófilos podrían tener interacciones de corta duración con los linfocitos dentro de los ganglios linfáticos, potenciando la polarización hacia la respuesta Th2 con liberación rápida de IL4 durante infecciones por helmintos y frente a algunos antígenos proalérgicos, que al administrar por vía intramuscular tiene mejor respuesta celular en las alpacas sometidas a estudio, esto indica que los basófilos se interactúan con los linfocitos motivo por el cual se muestra ligera basofilia; Sullivan *et al.* (2011), su estudio mostró que la producción de IL-4 o IL-3 por basófilos contribuye a la expulsión de los nemátodos durante la infección primaria cuando ambas citocinas no pueden ser producidas por las células T, pero si estas últimas las producen los basófilos pasan a ser redundantes, es probable que esta característica se haya presentado en las alpacas sometidas a estudio.

Tabla N° 19. Valores de basófilos en alpacas según el tiempo de la respuesta inmune celular con el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina.

TIEMPO	Promedio %.	Desviación estándar.	Error estándar de la media.	Valores Mínimos.	Valores Máximos.
TESTIGO	0,6087	1,30604	0,23845	0,00	6,00
3 DIAS	1,0000	1,14721	0,20945	0,00	5,00
9 DIAS	0,3704	0,77608	0,14169	0,00	3,00
15 DIAS	0,6800	0,81720	0,14920	0,00	3,00
Total	0,6458	1,05307	,09613	0,00	6,00

La tabla N° 19 muestra los valores de los basófilos según el tiempo, estos datos fueron analizados estadísticamente, se encontró diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) y corroborando con la prueba de Tukey

se encontró que el día 3 tuvo mayor resultado con respecto a los demás días y al control.

Con lo mencionado por Valdivia (2012) y a Sullivan *et al.* (2011) y evaluando nuestros resultados con respecto al tiempo se podría especular que después de la administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina hubo un incremento de los basófilos al tercer día para una posible eliminación de parásitos o problemas de antígenos y que luego de ello comenzaron a disminuir ya que el antígeno comenzaba a ser eliminado paulatinamente.

## V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una respuesta inmune celular en las alpacas estudiadas, en el conteo de leucocitos en general donde los mejores resultados fueron las administradas por la vía intramuscular, en segundo lugar la vía intravenosa y por último la vía subcutánea; en el contero de neutrófilos, ninguna vía de administración pudo superar a los datos obtenidos del control, al igual que los eosinófilos y monocitos; se presentó aumento en la vía intramuscular en comparación al subcutáneo, intravenoso y al control de linfocitos y basófilos.
- Durante el tiempo de estudio se pudo determinar que la respuesta inmune celular más óptima de los leucocitos fue a los 9 días post administración del fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina, y que luego de ello fue disminuyendo hacia el día 15. Los neutrófilos fueron los que mostraron tener mejores resultados hasta los 9 días, mientras que los linfocitos mostraron tener mejores resultados hasta los 15 días, los monocitos y basófilos mostraron resultados a los 3 días y por último los eosinófilos solo mostraron resultados altos el día del control.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el fosforo orgánico, ácido fólico y Cianocobalamina como medio complementario para elevar la respuesta inmune celular.
- Utilizar la vía intramuscular de fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas en la alpaca, por tener mejor respuesta inmune celular.
- Repetir la dosis de fosforo orgánico y vitaminas hematopoyéticas a los 9 o 15 días, que son los tiempos de mejor respuesta inmune celular.

## VII. REFERENCIAS

- Akira S., S. Uematsu, and O. Takeuchi 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124: 783-801.
- Alpers, D.H., R.E. Clouse, y W.F. Stenson. 1990. Folacinas. En: Manual de Terapéutica Nutricional. Salvat editores, S.A. Barcelona, España. pp: 25-31.
- Ameghino E. y J. De Martini. 1991. Mortalidad en crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. p 71-80.
- Brandan, N., A. Luponio, J. Gonzales y S. Klinzuk 2005. Linfocitos T. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina.
- Brandan, N., J. Aquino y A. Codutti. 2007. Respuesta Inmunitaria. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina.
- Brandan, N., I. Llanos y A. Rodrigues. 2012. Regulación Hormonal del Balance Fosfocálcico. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina.
- Brito, F., M. Yamazaki, S. Espinoza, O. Vasquez, J. Huerta y R. Berrón. 2003. Eosinófilos: Revisión de literatura. Artículo de revisión vol. 12, num. 2 pp 56-62.
- Carbajal, A. 2013. Manual de Nutrición y Dietética: Minerales y Vitaminas. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
- Carter, L. y K. Murphy. 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.
- Claerebout E. and J. Vercruysse. 2000. The immune response and evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematode in cattle. *Parasitol*, 120:525-542.
- Corrons, L. 2006. *Manual de Tecnicas de Laboratorio en Hematologia*. Barcelona España : ELSERVIER MASSON.S.A., 2006.
- Costa-Pereira A, W. Timothy, B. Strobl, D. Watling, J. Briscoe, and I. Kerr. 2002. The Antiviral Response to Gamma Interferon. *Journal of Virology*. 76(18): 9060- 9068.
- Dellman, H. 1980. "Histología Veterinaria", Editorial Acribia, Zaragoza España.
- Duncan, P. L. y R. T. Lovell. 1993. Dietary folic acid and bacterial infections in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Applied Aquaculture*. 3: 109–120.
- Ferguson A, and GE. Griffin. 2000. Nutrition and the immune system. En: Garrow JS, James WPT, Ralph A, ed. *Human Nutrition and Dietetics*. 10th ed. London: Churchill Livingstone; 747-764.
- Forrellat, M. y H. du Defaix. 1997. Papel del ácido fólico en la etiología de las anemias megaloblásticas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*.
- Ganong, W. 1988. *Fisiología Médica*. Octava Edición. Editorial El Manual Moderno. México D.F.
- Gentry, A., J. Clutton-Brock and CP. Groves. 2004. The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *J Archaeol Sci* 31(5): 645-651.
- Getty, R. 2005. *Anatomía de los animales domésticos*. Barcelona: MASSON S.A., 2005. 84-458-07226.

- Goldsby, R., T. Kindt, J. Kubly, and B. Osborne. 2002. Immunology Fifth Edition.
- Guerci, A. 1988. "Laboratorio, Métodos y Análisis Clínicos y su Interpretación".  
Editorial Ateneo. Barcelona España, Cuarta Edición.
- Helbert, V. and K. Das. 1994. Folic acid and vitamin B12. In "modern Nutrition in Health and Disease" (M.E. Shils, J.A. Olson, and M. Shike, Eds) 8<sup>th</sup> ed., pp 402-425. Lea and Febiger. Philadelphia.
- INEI. 2013. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik. 2003. Immunobiology: The immune system in health and disease. Garland Publishing. 5th Edition. 910p.
- Kadwell, M., M. Fernandez, HF. Stanley, R. Baldi, JC. Wheeler, R. Rosadio and MW. Bruford. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. Proc R Soc Lond 268: 2575-2584.
- Lazarowski, A. 2015. Transporte de vitamina B12. Un laberinto de una única entrada y múltiples caminos incompletos. HEMATOLOGÍA vol. 19 pp 208-221.
- Leach, M., N. Davidson, M. Fort, F. Powre and D. Rennik. 1999. The role of IL-10 in Inflammatory Bowel Disease: "Of Mice and Men". Toxicol. Pathol. 27: 123-133.
- Li, O. y A. Alvarado. 2007. "Evaluación de tolerancia y del efecto hematopoyético e inmunomodulador en un compuesto en base a fosforo orgánico, ácido fólico y cianocobalamina por diferentes vías de



- aplicación en bovinos” Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- McDowell, L.R. 1992. Es: Los minerales en nutrición animal y humana. Ed. L.R. McDowell. Prensa Académica, Nueva York. pp: 27-77
- Míguez, A. y D. Muñoz. 2009. Farmacocinética. Vías de administración de fármacos en Urgencias y Emergencias. Revista Electronica de PortalesMedicos.com – <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones>
- More, J. 2010. Citoquinas de la respuesta inmune celular y humoral. Sistemas de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. 1: 7.
- Molist, P. y M. Ponbal 2014. Facultad de Biología Universidad de Vigo Depto. De Biología Funcional y Ciencias de la Salud.
- Norambuena C. y M. Paredes. 2003. Variabilidad y estructura genética en dos poblaciones de *Vicugna vicugna* (Camelidae) del norte de Chile. Rev Chi Hist Nat 76(1): 99-104.
- NRC. 2001. National Research Council. Nutrient requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC. 360 p
- Pamer, E. 2007. Immune responses to comensal and environmental microbes. Nat. Immunol. 8(11): 1173-1178.
- Rhone, P. 2002. El manual de Merck de Veterinaria quinta edición en español Pulenc Company. Barcelona-España
- San Martin, F. 1991. Nutrición y Alimentación. En: “*Producción de Rumiantes Menores - Alpacas*”, editado por Novoa,C. y F. Flores. RERUMEN CUCD – INIAA. Lima, p. 359.
- Sarno, R.J., L. Villalba, C. Bonacic, B. González, B. Zapata, D. MacDonald, S.J. O’Brien and WE. Johnson. 2004. Phylogeography and subspecies

assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellites markers: implications for vicuña conservation and management. *Conservation Genetics* 5: 89-102.

- Schultz, M., S. Tonkonogy, R. Sellon, C. Veltkamp, V. Godfrey, J. Kwon, W. Grenther, E. Balish, I. Horak and R. Balfour Sartor. 1999. IL-2 deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276: G1461-G1472.
- Schroder, K., P. Hertzog, T. Ravasi and D. Hume. 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanism and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-189.
- SENAMHI, 2015. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. [http://www.senamhi.gob.pe/include\\_mapas/\\_dat\\_esta\\_tipo.php?estaciones=000764](http://www.senamhi.gob.pe/include_mapas/_dat_esta_tipo.php?estaciones=000764)
- Spellberg, B. and J. Edwards. 2001. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Infectious Diseases Society of America.* 32: 76-102.
- Suarez, M. 2003. Ácido Fólico: Nutriente Redescubierto. *Acta Médica Costaricense.* Vol. 45 num. 1 pp 5-9.
- Sullivan, B.M. 2011. Genetic analysis of basophil function in vivo. *Nature Immunol.* 12, 527-535.
- Tang, J. y J. Ruiz. 2006. "Evaluación de Tolerancia de una Combinación Inyectable sobre la Base de Fósforo (Butafosfan), Ácido Fólico y Cianocobalamina, sobre el incremento del metabolismo en Alpacas en la Sierra Central" Departamento de Junín, Perú.

- Tizard, I. 2009. Veterinary Immunology: An Introduction. 8th Ed. Saunders Elsevier. Missouri, United States. p 529.
- Tizard, I. 2002. Inmunología Veterinaria. 6th Ed. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. p 495.
- Valdivia, J. 2012. Mastocitos y basófilos y sus nuevas funciones en inmunología. Dermatol Perú, 23(2), 98-105.
- Vallenas, C. 1969. "Recopilación de las Cifras Medicas Normales de Algunos Componentes de la Sangre en Algunos Animales Domésticos En la Altura". Editorial Cóndor. Lima Perú.
- Valverde, R. 2006. Las Vitaminas y el Sistema Inmune. Escuela de Zootecnia. Universidad de Costa Rica.
- Vega, MA. 2007. Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. Cinvestav 26(1): 55- 59.
- Vega, G. 2009. Linfocitos. Revista de la Facultad de Medicina de UNAM, 51(6), 2.
- Vives, JL. 1988. Macrocitosis y anemia macrocítica. En: Hematología clínica. 2a ed. Barcelona: Ediciones Doyma.
- Wakil, A., Z. Wang, J. Ryan, D. Fowell and R. Locksley. 1998. Interferon  $\gamma$  derived from CD4 + T cell is sufficient to Mediate T helper cells Type 1 Development. J. Exp. Med. 188(9): 1651-1656.
- Waldron, M. 2013. Enhancing immunity and disease resistance of dairy cows through nutrition. Animal Science Research Center, Division of Animal Sciences. University of Missouri-Columbia, USA. p 10.

- Wheeler, JC, M. Fernández, R. Rosadio, D. Hoces, M. Kadwell y M.V. Bruford.  
2001. Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el  
Perú. *Rev Inv Vet Perú* 1: 170-183.
- Wheeler, J.C. 1995. Evolution and present situation of the South American  
Camelidae. *Bio J Lima Soc* 54: 271-295.
- Yagi, R., W. Suzuki, N. Seki, M. Kohyama, T. Inoue, T. Arai, and M. Kubo.  
2002. The IL-4 production capability of different strains of naive CD4+T  
cells controls the direction of the Th cells response. *International  
Immunology*. 14(1): 1-1

## VIII. ANEXOS

Tabla N° 20. Registro de las alpacas del estudio realizado.

N°	N° Arete	Peso Kg.	Via de administración	F. C. x Min.	Temperatura en C°
1	13S81E	60	INTRAMUSCULAR	80	37.2
2	13S43D	67	INTRAMUSCULAR	78	37.1
3	12S85E	61	INTRAMUSCULAR	60	37
4	13S95E	60.5	INTRAMUSCULAR	72	36.5
5	11S45E	68	INTRAMUSCULAR	52	37.1
6	11S183E	58.5	INTRAMUSCULAR	80	37.4
7	12S25E	63	INTRAMUSCULAR	82	37.6
8	13S73E	64	INTRAMUSCULAR	70	37.3
9	12S279E	64	INTRAMUSCULAR	92	37
10	11S13D	58	INTRAMUSCULAR	91	36.7
11	11S157E	62.5	SUBCUTANEO	67	36.6
12	11S191E	70	SUBCUTANEO	60	36.8
13	11S72E	53.5	SUBCUTANEO	63	36.7
14	11S195E	63.5	SUBCUTANEO	72	36.9
15	11S05D	51	SUBCUTANEO	60	36.5
16	12S237E	60	SUBCUTANEO	59	36.9
17	11S25D	61	SUBCUTANEO	64	37.3
18	13S107E	62	SUBCUTANEO	67	36.5
19	12S101E	51.5	SUBCUTANEO	108	36.6
20	13S54D	61.5	SUBCUTANEO	72	36.9
21	12S156E	64	INTRAVENOSO	112	37.8
22	13S364F	65	INTRAVENOSO	67	37.3
23	11S146E	66	INTRAVENOSO	63	36.8
24	11S35D	51	INTRAVENOSO	82	36.9
25	12S192E	50.5	INTRAVENOSO	88	36.8
26	12S216E	54	INTRAVENOSO	72	36.4
27	11S152E	71	INTRAVENOSO	64	36.5
28	13S491F	64.5	INTRAVENOSO	68	37.2
29	12S205E	61	INTRAVENOSO	124	37.1
30	11S253E	57.5	INTRAVENOSO	76	37.1

Tabla N° 21. ANDEVA del DBCA (3x4) para Leucocitos.

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: RBLANCOS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
VIAADMINISTRACION	35796500,00	2	17898250,00	4,005	,021
	0		0		
TIEMPO	211017166,6	2	105508583,3	23,612	,000
	67		33		
VIAADMINISTRACION	40600833,33	4	10150208,33	2,272	,066
* TIEMPO	3		3		
Error	491531916,6	111	4468471,970		
	67				
Total corregido	928908979,1	119			
	67				

a. R al cuadrado = ,471 (R al cuadrado ajustada = ,428)

Tabla N° 22. Prueba de significancia de Tukey para leucocitos.

**RBLANCOS**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

VÍA	N	Subconjunto	
		1	2
ADMINISTRACION			
SIN DROGA	30	9391,6667	
SUB CUTANEO	30		11510,0000
INTRA VENOSO	30		11545,0000
INTRA MUSCULAR	30		12865,0000
Sig.		1,000	,068

**RBLANCOS**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
TESTIG			
O	30	9391,6667	
3 DIAS	30	9808,3333	
15 DIAS	30		13016,6667
9 DIAS	30		13095,0000
Sig.		,871	,999

Tabla N° 23. ANDEVA del DBCA (3x4) para Linfocitos.

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: LINFOCITOS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
VIAADMINISTRACION	19,400	2	9,700	,154	,857
TIEMPO	666,067	2	333,033	5,301	,006
VIAADMINISTRACION * TIEMPO	334,933	4	83,733	1,333	,262
Error	6911,167	111	62,829		
Total corregido	8239,592	119			

a. R al cuadrado = ,161 (R al cuadrado ajustada = ,093)

Tabla N° 24. Prueba de significancia de Tukey para linfocitos.

**LINFOCITOS**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
TESTIG	30	33,8667	
O	30	34,0667	
9 DIAS	30	37,9333	37,9333
3 DIAS	30		40,7000
15 DIAS	30		
Sig.		,199	,532

Tabla N° 25. ANDEVA del DBCA (3x4) para Monocitos.

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: MONOCITOS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
VIAADMINISTRACION	,422	2	,211	,446	,642
TIEMPO	2,156	2	1,078	2,276	,108
VIAADMINISTRACION * TIEMPO	3,444	4	,861	1,818	,130
Error	52,100	111	,474		
Total corregido	58,592	119			

a. R al cuadrado = ,111 (R al cuadrado ajustada = ,038)

Tabla N° 26. Prueba de significancia de Tukey para Monocitos.

**MONOCITOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
15 DIAS	30	,2000
9 DIAS	30	,3000
TESTIG O	30	,5000
3 DIAS	30	,5667
Sig.		,172

Tabla N° 27. ANDEVA del DBCA (3x4) para Neutrófilos.

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: NEUTROFILOS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
VÍA ADMINISTRACION	107,467	2	53,733	,806	,449
TIEMPO	596,600	2	298,300	4,475	,014
VÍA ADMINISTRACION * TIEMPO	284,533	4	71,133	1,067	,376
Error	7331,800	111	66,653		
Total corregido	8496,800	119			

a. R al cuadrado = ,137 (R al cuadrado ajustada = ,067)



Tabla N° 28. Prueba de significancia de Tukey para Neutrófilos.

**NEUTROFILOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

VÍA	N	Subconjunto
ADMINISTRACION		1
INTRA MUSCULAR	30	59,0000
INTRA VENOSO	30	60,5333
SUB CUTANEO	30	61,6667
SIN DROGA	30	63,2000
Sig.		,197

**NEUTROFILOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
15 DIAS	30	57,6333	
3 DIAS	30	59,7333	59,7333
TESTIG O	30		63,2000
9 DIAS	30		63,8333
Sig.		,752	,216

Tabla N° 29. ANDEVA del DBCA (3x4) para Eosinófilos.

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: EOSINOFILOS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
VÍA ADMINISTRACION	9,356	2	4,678	1,834	,165
TIEMPO	8,956	2	4,478	1,756	,178
VÍA ADMINISTRACION * TIEMPO	9,378	4	2,344	,919	,456
Error	280,567	111	2,551		
Total corregido	318,592	119			

a. R al cuadrado = ,119 (R al cuadrado ajustada = ,047)

Tabla N° 30. Prueba de significancia de Tukey para Eosinófilos.

**EOSINOFILOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

VÍA	N	Subconjunto	
		1	2
ADMINISTRACION			
SUB CUTANEO	30	,4333	
INTRA VENOSO	30	1,1000	1,1000
INTRA MUSCULAR	30	1,1333	1,1333
SIN DROGA	30		1,5667
Sig.		,330	,671

**EOSINOFILOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
3 DIAS	30	,6333
15 DIAS	30	,7000
9 DIAS	30	1,3333
TESTIG O	30	1,5667
Sig.		,113

Tabla N° 31. ANDEVA del DBCA (3x4) para Basófilos.

**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: BASOFILOS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
VÍA ADMINISTRACION	8,600	2	4,300	4,118	,019
TIEMPO	7,400	2	3,700	3,543	,032
VÍA ADMINISTRACION * TIEMPO	1,000	4	,250	,239	,915
Error	114,867	111	1,044		
Total corregido	131,967	119			

a. R al cuadrado = ,130 (R al cuadrado ajustada = ,058)

Tabla N° 32. Prueba de significancia de Tukey para Basófilos.

**BASOFILOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

VÍA	N	Subconjunto	
		1	2
ADMINISTRACION			
SUB CUTANEO	30	,5333	
INTRA VENOSO	30	,6333	,6333
SIN DROGA	30	,8667	,8667
INTRA MUSCULAR	30		1,2333
Sig.		,588	,110

**BASOFILOS**  
HSD Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
9 DIAS	30	,4667	
15 DIAS	30	,7667	,7667
TESTIG O	30	,8667	,8667
3 DIAS	30		1,1667
Sig.		,431	,431

**FIGURAS**

Figura N° 1 Muestra el alcohol yodado, guantes de procedimiento, algodón y pintura en Sprite.



Figura N° 2. Muestra las jeringas, catéteres, porta agujas vacutainer, tubos vacutainer y agujas vacutainer.



Figura N° 3. Muestra la caja de Tecnopor, termómetro, estetoscopio, balanza y ecografía utilizados.



Figura N° 4. Muestra el momento donde se realizó la ecografía a las alpacas para asegurarse de que no se encuentran preñadas.



Figura N° 5. Muestra el procedimiento de toma de muestra de sangre de la vena yugular.



Figura N° 6. Muestra la caja de Tecnopor con las primeras muestras de sangre en los tubos vacutainer.



Figura N° 7. Muestra la primera toma de muestra de sangre de las alpacas en el lugar de pastoreo.



Figura N° 8. Muestra el lugar donde se realiza la punción para la toma de muestra sanguínea.



Figura N° 9. Muestra el momento en el que se esta tomando la muestra de sangre.



Figura N° 10. Muestra el lugar de pastoreo donde se encontraban las alpacas en estudio.



Figura N° 11. Muestra las alpacas en el corral donde se realizó la toma de muestras de sangre.



Figura N° 12. Muestra la forma para sujetar a la alpaca para realizar una toma de muestra sanguínea sin mucha laceración.





Figura N° 13. Muestra los 30 tubos vacutainer con las muestras sanguíneas.



Figura N° 14. Equipo de hematología Hemix 3-30 SFRI.



Figura N° 15. Primer reactivo que se usa para el equipo Hemix 3-30 SFRI



Figura N° 16. Segundo reactivo que se usa para el equipo Hemix 3-30 SFRI.

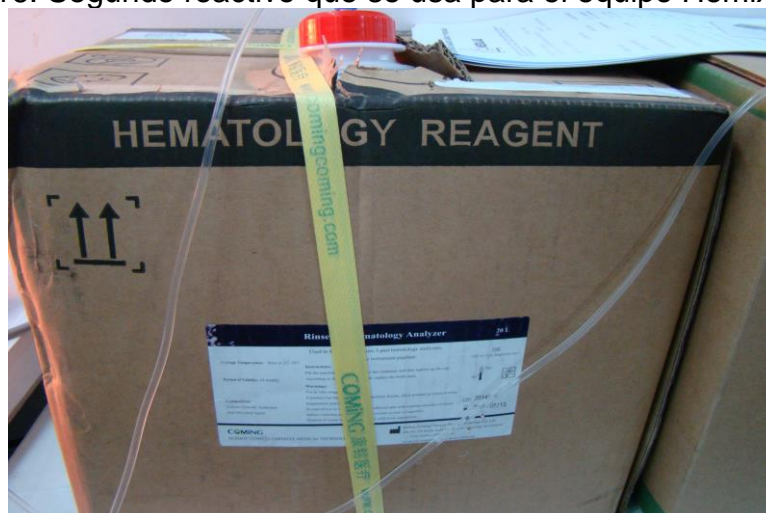


Figura N° 17. Tercer reactivo que se usa para el equipo Hemix 3-30 SFRI



Figura N° 18. Equipo completo de hematología hemix 3-30 SFRI.



Figura N° 19. Muestra el procedimiento antes de llevarlo al equipo de hematología hemix 3-30 SFRI



Figura N° 20. Muestra la forma de como el equipo toma una pequeña muestra de sangre para su análisis.



Figura N° 21. Resultados que emite el equipo de hematología hemix 3-30 SFRI en su pantalla.

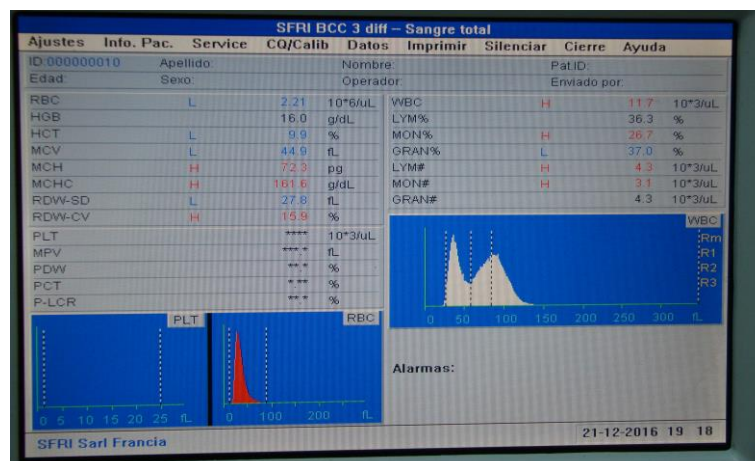


Figura N° 22. Resultado emitido por el equipo mencionado.

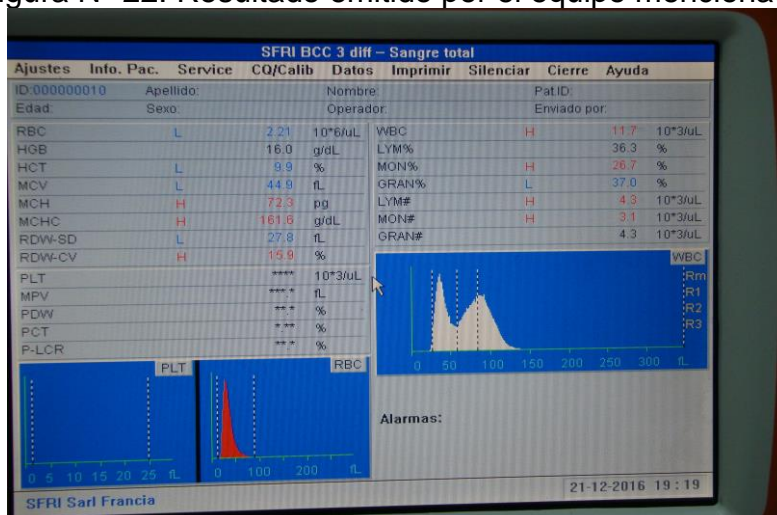


Figura N° 23. Solución turk

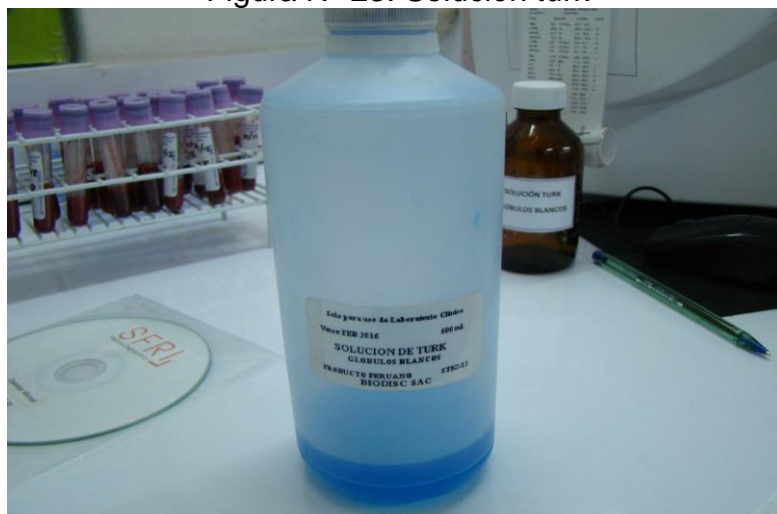


Figura N° 24. Laminas porta objetos con el coloreado mediante la técnica de portaobjetos en cuña para el conteo de los glóbulos blancos.



Figura N° 25. Microscopio usado para para el conteo de los glóbulos blancos.

