

Trabajo Fin de Máster

Niveles séricos de citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ de corderos sanos desde el nacimiento hasta el primer mes de vida

Autor

Diana Marteles Aragüés

Director

Dr. Antonio Fernández Casasnovas

Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza
2011-2012

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	pág. 2
2. INTRODUCCIÓN.....	pág. 4
3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	pág. 10
4. MATERIAL Y METODOS.....	pág. 11
5. RESULTADOS.....	pág. 14
Corderos sanos	pág 14
Corderos enfermos	pág. 20
6. DISCUSIÓN.....	pág. 23
7. CONCLUSIONES.....	pág. 29
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	pág. 30

1. RESUMEN

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que a bajas concentraciones regulan la función de células y tejidos. Su importancia en los neonatos y la evolución de sus concentraciones durante las primeras semanas de vida han sido bien estudiadas en distintas especies de animales domésticos y en niños recién nacidos. Sin embargo, en corderos, no se han estudiado las concentraciones séricas basales durante el primer mes de vida ni tampoco se conoce como se modifican dichas concentraciones en presencia de infecciones o de otro tipo de patología.

El objetivo de nuestro estudio fue establecer las concentraciones séricas de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en corderos sanos y sus variaciones a lo largo del primer mes de vida para tener unos valores base sobre los cuales poder comparar valores séricos de estas citocinas en corderos enfermos y determinar si estos resultados tenían algún valor predictivo.

Se obtuvieron muestras de sangre de 15 corderos sanos a lo largo del primer mes de vida a los 0 días (sin tomar calostro), 1 día, 4 días, 11 días, 18 días y 28 días de edad. Se recogió también sangre de 14 corderos de dos explotaciones distintas que presentaban diarrea a los 11 y 18 días de vida para determinar si la enfermedad afectaba a su nivel de citocinas. La concentración sérica de citocinas se analizó mediante kits ELISA comerciales.

Se establecieron los valores normales de concentración sérica de las distintas citocinas en corderos sanos a lo largo del primer mes de vida y se estudió si existía algún efecto en dicha concentración en función del sexo o del peso al nacimiento así como si había alguna correlación entre las distintas citocinas. En cuanto a los animales enfermos, se estudió si había alguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores de las citocinas de corderos enfermos al compararlas con las concentraciones en corderos sanos de su misma edad.

En corderos sanos no se detectó ninguna de las tres citocinas en suero en el momento del nacimiento (antes de tomar el calostro). El nivel más alto de concentración se detectó a las 24-48 horas y luego se observó que descendía progresivamente hasta los 28 días de edad. No se encontró ningún efecto del sexo sobre los niveles de citocinas en ninguno de los momentos analizados. Se halló un efecto del peso al nacimiento a los 18

días de edad, siendo el nivel de las citocinas analizadas menor en los corderos más pequeños. En los corderos enfermos se encontraron concentraciones séricas significativamente superiores de las citocinas IL-1 β e IL-6 con respecto a los animales sanos de la misma edad, lo que sugería un proceso patológico que cursaba con una respuesta inflamatoria sistémica. Se comprobó que las citocinas IL-1 β e IL-6 presentaban una correlación positiva tanto en el caso de los corderos enfermos como en los corderos sanos, este hallazgo junto con el anterior nos permite pensar que la determinación de una de las dos citocinas puede ser de utilidad como indicativo de un proceso patológico que curse con una respuesta inflamatoria sistémica como por ejemplo, una infección.

En conclusión, hemos establecido los niveles séricos basales de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en nuestra población de corderos sanos durante el primer mes de vida y hemos comparado estos resultados con los niveles séricos de estas tres citocinas de corderos enfermos de la misma edad que presentaban diarrea. Las concentraciones séricas de IL-6 e IL-1 β están elevadas en los corderos con diarrea y esto se explica porque estas citocinas están implicadas en la respuesta inmune innata del organismo. Además, sus concentraciones séricas están correlacionadas positivamente y podrían utilizarse como indicadores de procesos patológicos que conlleven una respuesta inflamatoria sistémica. Se necesitan nuevos estudios con un número mayor de animales para establecer el valor predictivo que pueden tener estas citocinas en la mortalidad o la morbilidad en corderos.

2. INTRODUCCIÓN

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (15-30 KDa) constituidas por 120-180 aminoácidos que regulan la función de las células que las producen y de otros tipos celulares actuando tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Scheerlinck y Yen, 2005). En general, son producidas por leucocitos pero algunas citocinas pueden ser secretadas por otros tipos de células.

La expresión de la mayoría de las citocinas está estrictamente regulada y es necesaria la activación celular para que se produzcan en cantidad suficiente para ejercer sus efectos biológicos. En general, las citocinas son secretadas al espacio extracelular de forma glicosilada aumentando así su estabilidad y solubilidad. No obstante, algunas se acumulan en el interior de las células o bien permanecen ancladas a la pared celular o en la matriz extracelular (Tizard, 2009).

Las citocinas suelen tener una vida media muy corta y actúan a concentraciones muy bajas del orden de picogramos (pg) mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros tipos celulares. Pueden ejercer un efecto autocrino cuando se unen a receptores de la célula productora, paracrino cuando actúan sobre células vecinas, o endocrino si se liberan a sistema circulatorio o linfático y actúan en otros órganos y tejidos.

Dos características funcionales esenciales de las citocinas son la capacidad de una misma citocina para ejercer efectos biológicos diferentes actuando sobre distintos tipos celulares y el hecho de que varias citocinas pueden ejercer la misma función. La primera de estas características se conoce con el nombre de pleiotropismo y la segunda como redundancia. Estas características favorecen que una citocina ausente pueda ser reemplazada total o parcialmente por otras que actuarán ejerciendo el efecto biológico deseado. Además, las acciones de estas moléculas están inmersas en una red estrechamente regulada por las mismas moléculas del sistema, de forma que una citocina puede inhibir o potenciar a otra que a su vez puede actuar sobre los receptores de la primera.

Los efectos biológicos ejercidos por este tipo de proteínas son muy diversos. Participan en la embriogénesis y en el desarrollo de los órganos, en procesos neuroinmunes y neuroendocrinos, y muchas son regladoras de procesos celulares como la mitosis, la

diferenciación, la migración o la muerte celular. Las citocinas también desempeñan un papel esencial en la regulación de la respuesta inmunológica y en la correcta maduración del sistema inmune del neonato.

Según Scheerlinck y Yen (2005), las funciones de las citocinas se pueden dividir en siete grupos: proliferación de linfocitos y diferenciación, interacción con el sistema nervioso, desarrollo linfoide, regulación celular, arquitectura de las células linfoideas, control del efectos del sistema inmune y de la inflamación, inmunidad innata y presentación de antígeno. Esta división resulta útil a nivel didáctico pero en la realidad una misma citocina puede desempeñar funciones de varios grupos distintos debido a que presentan pleitropismo como hemos indicado con anterioridad.

Otra forma de clasificación de las citocinas es en función del papel que desempeñan en la infección y la inflamación. Las infecciones bacterianas sistémicas inician una respuesta del organismo afectado caracterizada por la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ y TNF- α) las cuales inician los mecanismos de defensa. También encontramos citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TGF- β), las cuales controlan la inflamación y mantienen la homeostasis (Gald et al. 2007).

Es difícil establecer una clasificación debido a su alto grado de pleiotropismo, no obstante, según otros autores se pueden establecer tres grupos en función de sus funciones más relevantes: citocinas implicadas en el desarrollo hematopoyético (IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11), citocinas implicadas en la respuesta inmune innata (IL-1, IL-6, IL-12, IFN- α , TNF- α), y, finalmente las citocinas implicadas en la respuesta inmune adaptativas (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13). (Tizard, 2009).

Origen y funciones de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ

Hay multitud de citocinas con funciones muy diversas y con efectos que se solapan unos con otros debido al gran pleitropismo que presentan estas proteínas. No es nuestra intención detallar las acciones de cada citocina pero sí comentar las características más relevantes de las tres citocinas que hemos analizado en nuestro estudio: IL-1 β , IL-6 e IFN- γ .

La principal función de la IL-1 β , similar a TNF, es como mediador de la respuesta inflamatoria sistémica frente a infecciones (Abbas y Lichtman, 2004). La IL-1 β es, junto con la IL-1 α , una de las formas de la IL-1 que es producida por monocitos y macrófagos fundamentalmente, aunque también es secretada por células dendríticas, endoteliales, natural killer (NK) y otros tipos celulares. Se trata de una citocina pro-inflamatoria que induce la liberación de histamina por los mastocitos generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. Es el principal pirógeno endógeno y actúa a través de la producción de prostaglandinas. También promueve la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos e induce sueño y anorexia actuando sobre el sistema nervioso central. (Tizard, 2009).

La IL-6 se produce principalmente en monocitos y macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la citocina anterior es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, en especial fibrinógeno, actuando como mediador en la respuesta inflamatoria sistémica. También promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas induciendo la producción de inmunoglobulinas. Puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de precursores hematopoyéticos. Fundamentalmente, como en el caso de la IL-1 β , actúa en la respuesta inmune innata. (Abbas y Lichtman, 2004).

El IFN- γ lo producen linfocitos helper tipo 1 (Th1), linfocitos T citotóxicos (LTC) y células NK. Presenta una actividad inmunomoduladora muy importante y efecto antiviral. Facilita la función presentadora de antígeno mediante el aumento de la expresión de antígenos y activa a los macrófagos incrementando su efecto antitumoral y antiinfeccioso. Sobre las células NK actúa de forma autocrina aumentando su actividad citolítica e incrementando su efecto antitumoral. Inhibe la proliferación de linfocitos Th2 favoreciendo la diferenciación de los linfocitos a células efectoras Th1 favoreciendo el desarrollo de las respuestas inflamatorias. Fundamentalmente actúa en la respuesta inmune adquirida.

Las citocinas y el sistema inmune del neonato

Las citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , junto con otras, están presentes en el calostro de los mamíferos y también en la leche aunque en menor concentración (Hakiwara et al. 2000; Alluwaimi, 2004; Nguyen et al. 2007; Castellote et al. 2011). Estas citocinas presentes

en el calostro se absorben a través de la pared intestinal en las primeras horas de vida favoreciendo la protección del neonato frente a patógenos y la maduración de su sistema inmunitario.

Las citocinas, junto con inmunoglobulinas, linfocitos y otras macromoléculas, están presentes en el calostro que necesita ingerir el neonato para completar su correcta maduración inmunológica. Los rumiantes, debido a que el tipo de placenta que presentan (sindesmocorial) no permite la transferencia de algunas de estas moléculas, precisan de la ingestión del calostro que no sólo aporta una correcta nutrición sino que favorece la adecuada maduración del sistema inmunitario del neonato (Yamanaka et al. 2003). La falta de aporte de inmunoglobulinas, citocinas, células y demás moléculas presentes en el calostro se conoce como fallo de la transferencia de la inmunidad pasiva y, en muchas ocasiones, termina con la muerte del animal dado que su sistema inmune no es capaz de protegerlo frente a las agresiones de patógenos ambientales (Weaver et al. 2000; Tizard, 2009).

En los animales recién nacidos, los niveles de citocinas en suero sanguíneo son muy bajos o nulos y se incrementan progresivamente a medida que ingieren el calostro. El calostro, que es aportado por la madre las primeras horas de vida al neonato por vía digestiva, es una fuente indispensable de citocinas que se absorben en el intestino alcanzando la sangre rápidamente durante las primeras horas de vida (Nguyen et al. 2007; Burton et al. 2009; Secor et al. 2012).

Los primeros estudios sobre las citocinas en calostro humano se centraron en la presencia de estas proteínas y su transmisión al recién nacido dándole una relevancia especial a la IL-6 (Sullivan et al. 1992). También se investigó la relación de los niveles de estas proteínas en el suero sanguíneo de niños lactantes que presentaban sepsis (Rudloff et al. 1993). La investigación de las citocinas y su relevancia en el neonato humano sigue en primera línea centrándose en su importancia en pacientes con distintas enfermedades y en su utilidad como predictor de mortalidad y morbilidad (Satar et al. 2008).

En un estudio en terneros Yamanaka et al. (2003) observaron la presencia de citocinas en suero de terneros neonatos atribuyéndolas a la ingestión del calostro. En este estudio se comprobó que ninguna de las cinco citocinas estudiadas (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α

y IL-1 receptor agonista) estaban presentes en el momento del nacimiento y, sin embargo, conforme comenzaban el encalostrado, las concentraciones iban aumentando en el suero de los terneros hasta alcanzar un pico a las 24 horas, momento en que empezaban a descender hasta hacerse imperceptibles a las cuatro semanas tras el nacimiento.

Otro estudio similar se realizó en lechones por Nguyen et al. (2007) quienes comprobaron que las citocinas no se encontraban presentes en el suero del lechón antes de haber tomado el calostro exceptuando IL-12 y TGF- β . Estos investigadores encontraron el pico de concentración de las citocinas a las 24-48 horas tras el nacimiento siendo algo posterior en la IL-6 que en IFN- γ .

Las citocinas más importantes, según las investigaciones más recientes, para la correcta maduración del sistema inmune del recién nacido son IL-1 β , TNF- α , IL-6 e TNF- γ (Yamanaka et al. 2003; Nguyen et al. 2007; Burton et al. 2009; Secor et al. 2012). Se han estudiado los valores basales de estas citocinas en suero de neonatos sanos para establecer la variación de las concentraciones a lo largo del primer mes de vida en varias especies (humana, vacuna, porcina, equina) y poder comparar así con neonatos enfermos sugiriéndose que estos valores podrían utilizarse como valor predictivo de morbilidad y mortalidad (Burton et al. 2009).

En potros se compararon los valores de IL-6 en animales sanos y animales sépticos. Se observó que los niveles de IL-6 en el suero de los potros no era detectable hasta la ingestión del calostro y que los animales con sepsis presentaban valores inferiores de IL-6 que en los animales sanos lo que atribuían al fallo en la transferencia de la inmunidad pasiva de los potros enfermos (Burton et al. 2009). Estos autores constataban la importancia como valor pronóstico de septicemia en potros del ratio de IL-6: IL-10.

La metodología utilizada habitualmente para la detección de citocinas en suero de neonatos o calostro son inmunoensayos como es el test de ELISA (Wood et al. 1990b). También es posible mediante la combinación de técnicas de ELISA y citometría de flujo cuantificar y caracterizar las células productoras de citocinas (Takahashi et al. 2010) o la utilización de técnicas de RT-PCR (Craig et al. 2007; Gold et al. 2007) que permiten detectar y medir los niveles de RNAm que codifican una determinada citocina.

Poco se ha estudiado del nivel de citocinas en calostro ovino o del nivel sérico que presentan en el recién nacido. Los trabajos que existen estudian la expresión de los genes que regulan las citocinas en corderos infestados por parásitos (Craig et al. 2007) o frente a *Clamydia psittaci* (Entrican et al. 1998), o el papel que desempeñan IL-6 y TNF- α en la regulación de linfocitos en los nódulos linfáticos (Wee et al. 2011). Sin embargo, no existen datos sobre el nivel en suero sanguíneo de citocinas en corderos sanos durante el primer mes de vida ni del posible valor predictivo que pueda tener su concentración en corderos enfermos.

Con el presente estudio pretendemos establecer las concentraciones de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en corderos sanos y sus variaciones a lo largo del primer mes de vida para tener una base sobre la cual poder comparar valores de estas citocinas en corderos enfermos y establecer si estos resultados tienen algún valor predictivo.

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Las investigaciones acerca de las citocinas en animales recién nacidos y lactantes se han centrado sobre todo en las especies humana, porcina, vacuna y equina. Hasta el momento, no hay ningún estudio que establezca los niveles de citocinas IL-1 β , IL-6 o IFN- γ en suero sanguíneo de corderos sanos a lo largo del primer mes de vida. Tampoco se ha estudiado cómo varían las concentraciones de estas citocinas en suero de corderos enfermos.

El planteamiento de nuestro estudio fue establecer un protocolo similar al realizado por Yamanaka et al. (2003) pero orientado a la especie ovina para establecer los niveles basales de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en suero de corderos sanos durante el primer mes de vida y compararlo con suero de corderos enfermos.

En base a este punto de partida los objetivos de nuestro estudio fueron:

- Determinar niveles normales de citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en suero sanguíneo de corderos sanos, en seis momentos, desde el nacimiento hasta el primer mes de vida y comprobar si existe correlación entre los valores de estas tres citocinas.
- Determinar los valores de las citocinas IL-6, IL-1 β e IFN- γ en suero sanguíneo de corderos afectados por diarrea y si estos valores se modifican debido al proceso patológico.
- Determinar si existe un efecto del sexo y del peso al nacimiento con respecto a los niveles normales de citocinas en suero sanguíneo de los corderos sanos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de los animales

Corderos sanos. Se seleccionaron 15 corderos sanos nacidos a finales de febrero de 2011 en una explotación de ovejas de la raza Rasa Aragonesa situada en Ejea de los Caballeros, provincia de Zaragoza. Todos los corderos provenían de partos dobles excepto uno. Las ovejas parieron sin ayuda y no se les administró ningún medicamento en el momento del parto. Los corderos fueron identificados con un crotal, se anotó el sexo registrándose 9 machos y 6 hembras, y, se distribuyeron en dos grupos en función del peso (5 corderos pequeños < 3,5kg y 10 corderos grandes > 3,5kg).

La primera muestra de sangre se obtuvo antes de que comenzaran a mamar. Después de la primera toma de calostro, se desinfectó el cordón umbilical y se les administró vitamina AD₃E por vía intramuscular. Los corderos se observaron diariamente durante los 28 días del estudio sin encontrar signos de enfermedad ni registrar ninguna baja por mortalidad.

Corderos enfermos. Se seleccionaron 14 corderos afectados por diarrea nacidos en octubre y noviembre de 2011 en dos explotaciones de ovejas de raza Rasa Aragonesa de la provincia de Zaragoza. En la explotación A se seleccionaron 7 corderos con diarrea de once días de edad y en la B se seleccionaron 7 corderos con diarrea que tenían dieciocho días de edad de vida media. El manejo de estas dos explotaciones fue el habitual en la zona y los corderos fueron correctamente encalostrados.

Recogida y procesado de muestras

Corderos sanos. Se tomaron muestras de sangre venosa de la vena yugular externa mediante tubos de vacío antes de comenzar el encalostrado (T1), a las 24 horas del nacimiento (T2), a los 4 días (T3), a los 11 días (T4), a los 18 días (T5) y a los 28 días (T6). En todos los casos las muestras se tomaron entre las 8 y las 10 de la mañana.

Corderos enfermos. Para valorar la variación de la concentración de las citocinas en animales con patología se decidió detectar, con ayuda de un veterinario clínico, animales que tuvieran diarrea por ser este el proceso más frecuente en corderos de

temprana edad. Se recogieron muestras de sangre (4 ml) con tubos de vacío de 7 animales con diarrea de la explotación A cuyos animales tenían una edad media de 11 días y de otros 7 corderos con diarrea de la explotación B con una media de edad de 18 días. Las dos explotaciones pertenecían a la provincia de Zaragoza y tenían un manejo igual al seguido en la explotación de los corderos sanos.

En todos los corderos se recogió una historia consistente en la fecha de nacimiento, peso al nacimiento, si provenía de parto doble o simple, sexo, presencia o no de patología y si hubo un correcto encalostrado.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en todo momento por el veterinario responsable de la explotación. Se obtuvieron 4 ml de sangre venosa de la vena yugular externa con técnica estéril que se recogieron en un tubo sin aditivos y se etiquetaron convenientemente. Fueron enviadas inmediatamente tras su extracción al Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza donde se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min para obtener el suero que se congeló a -80°C en tubos Eppendorf para su análisis posterior debidamente etiquetado e identificado.

Detección y cuantificación de citocinas en suero por ELISA

Todas las muestras de suero fueron procesadas para analizar la presencia de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ utilizando una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) tipo sándwich.

Tanto la IL-6 como la IL-1 β se analizaron mediante kits comerciales específicos para cada citocina ovina del laboratorio *NovaTeinBio Inc (Cambridge, USA)*, mientras que el kit utilizado para el análisis de IFN- γ de ovino fue adquirido a través del laboratorio *MabTech Inc (Cincinnati, USA)*.

Las densidades ópticas (OD) se leyeron a 450 nm utilizando un lector de ELISA (Labsystem Multiskan, RC, Finlandia) y tras calcularse la media de dos lecturas estas densidades ópticas se transformaron en concentraciones (pg/ml) por extrapolación con el estándar de cada una de las citocinas facilitado por la casa comercial correspondiente. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y en todas las placas se colocó un blanco y un estándar facilitado por la casa comercial. En el caso de IL-6 no se

determinó el momento T6 por falta de muestra. En todos los casos el límite de detección del kit fue de 5 pg/ml.

Análisis estadísticos

Se utilizó el programa “Statview 4.1” para el tratamiento estadístico de los datos. Se realizó una estadística descriptiva y un análisis de la distribución de las frecuencias en cada una de las citocinas estudiadas. Debido al pequeño tamaño de la muestra y que su distribución no era normal se utilizaron pruebas no paramétricas. Para estudiar el efecto del sexo o el peso al nacimiento se utilizó un test de Mann-Whiney. El análisis de correlación entre las tres citocinas se determinó mediante una prueba de Spearman Rank Correlation. Con los datos de los animales enfermos se realizó una prueba One-Sample Sign Test comparando así los valores medios obtenidos con los correspondientes a los de los animales sanos de la misma edad (11 y 18 días respectivamente). En todos los casos se consideró un valor de $p<0,05$ como estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

- CORDEROS SANOS

IL-1 β

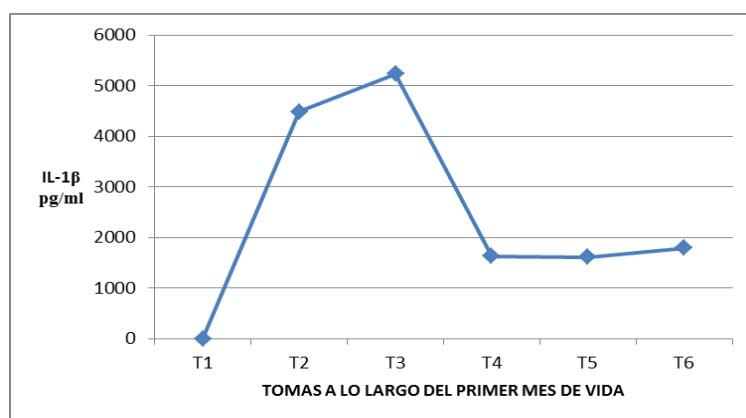
Variación de la concentración sérica de IL-1 β en el primer mes de vida

La citocina no fue detectada en suero de los animales antes de tomar calostro (T1). Se observó que el pico de concentración de la citocina fue a los 4 días del nacimiento como puede observarse en la tabla 1 luego comenzó a bajar lentamente hasta T5 y T6 donde se estabilizó.

Tabla 1. Valores de IL-1 β (pg/ml) en suero de corderos sanos durante el primer mes de vida.

	Media	Desv. est ^á dard	Error est ^á dard	Mínimo	Máximo
T2	4482	2739	707	1015	11123
T3	5234	2461	682	2004	10838
T4	1630	580	155	775	2694
T5	1612	583	156	836	3174
T6	1790	494	132	735	2827

En la gráfica 1 podemos observar la evolución de las concentraciones séricas de IL-1 β a lo largo del primer mes de vida en corderos sanos.



Gráfica 1 Evolución de la concentración sérica de IL-1 β en corderos sanos durante el primer mes de vida (pg/ml).

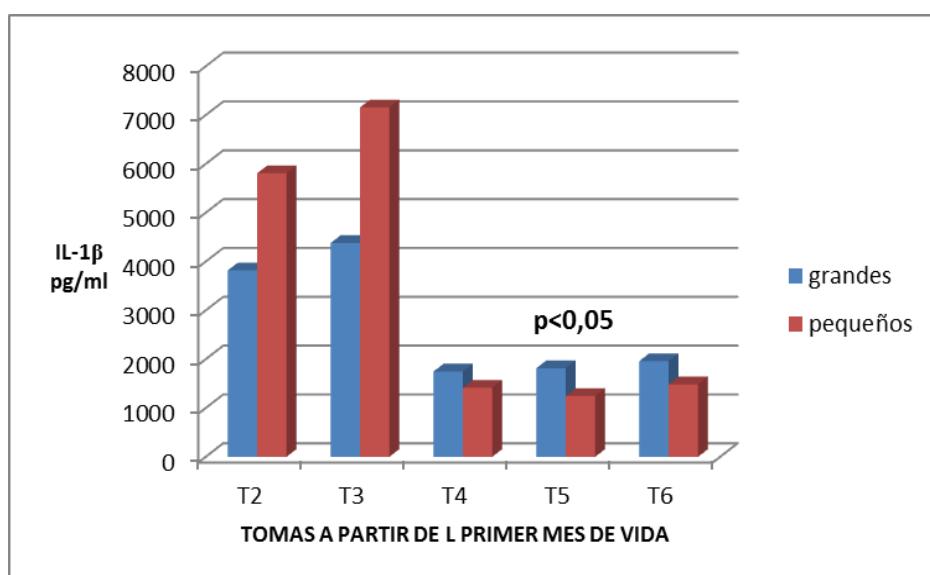
Efecto del sexo y del peso al nacimiento

No se encontraron diferencias significativas en función del sexo en ninguno de los momentos estudiados como se puede ver en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto del sexo en la concentración de IL-1 β (pg/ml).

	Hembras	Machos	Valor de p
T2	3312 ± 1370	5262 ± 3201	0,2888
T3	5213 ± 2073	5253 ± 2921	0,8864
T4	1659 ± 537	1608 ± 646	0,8973
T5	1591 ± 331	1628 ± 744	0,6056
T6	1853 ± 212	1743 ± 644	0,3662

En la gráfica2 se presentan los resultados del efecto del peso al nacimiento sobre los valores de IL-1 β . Hubo una tendencia en T2 y T3 a que los animales pequeños tuvieran mayores concentraciones séricas de IL-1 β pero no fueron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$). Posteriormente se invirtió esta tendencia, siendo los animales que tenían mayor peso al nacimiento los que presentan una mayor concentración, resultando en el momento T5 estadísticamente significativo ($p<0,05$).



Gráfica 2. Valores medios de concentración sérica de IL-1 β según el peso a lo largo del primer mes de vida (pg/ml).

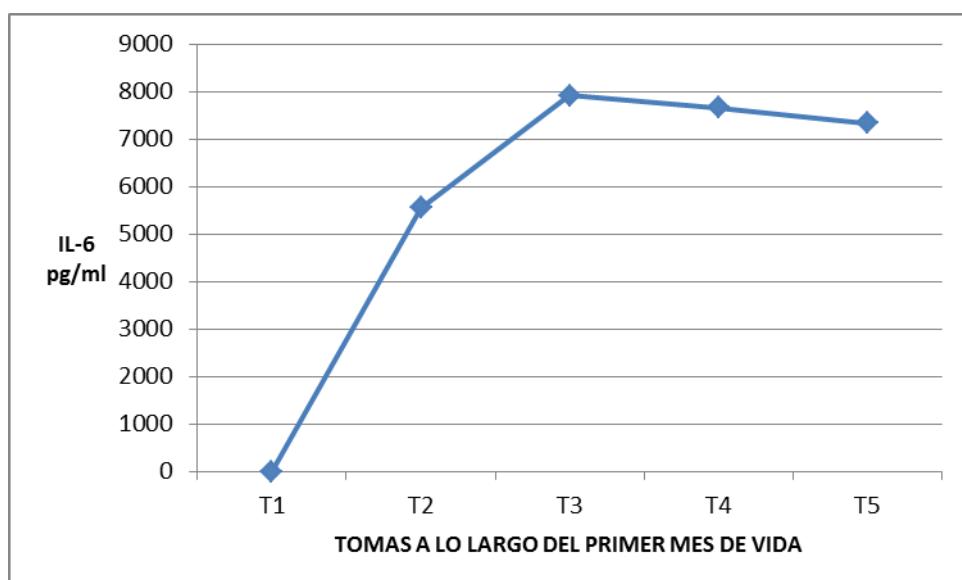
IL-6

Variación de la concentración sérica de IL-6 en el primer mes de vida

La citocina no se detectó en suero de los animales antes de tomar calostro (T1). Se observó, como se muestra en la tabla 3, que en este caso el pico de concentración de la citocina era algo posterior, a los 4 días del nacimiento y luego comenzaba a bajar lentamente hasta T5. En la gráfica 2 se detalla la evolución de las concentraciones medias de IL-6 a lo largo del primer mes de vida, podemos ver que a partir de la toma T3 la concentración media se mantuvo por debajo de 8000 pg/ml.

Tabla 1. Valores de IL-6 (pg/ml) en suero de corderos sanos durante el primer mes de vida.

	Media	Desv. estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
T2	5550	2705	698	2797	11321
T3	7910	2329	601	3571	12030
T4	7653	2389	616	3753	11926
T5	7336	2639	681	3056	13051



Gráfica 1. Evolución de la concentración sérica de IL-6 en corderos sanos durante el primer mes de vida (pg/ml).

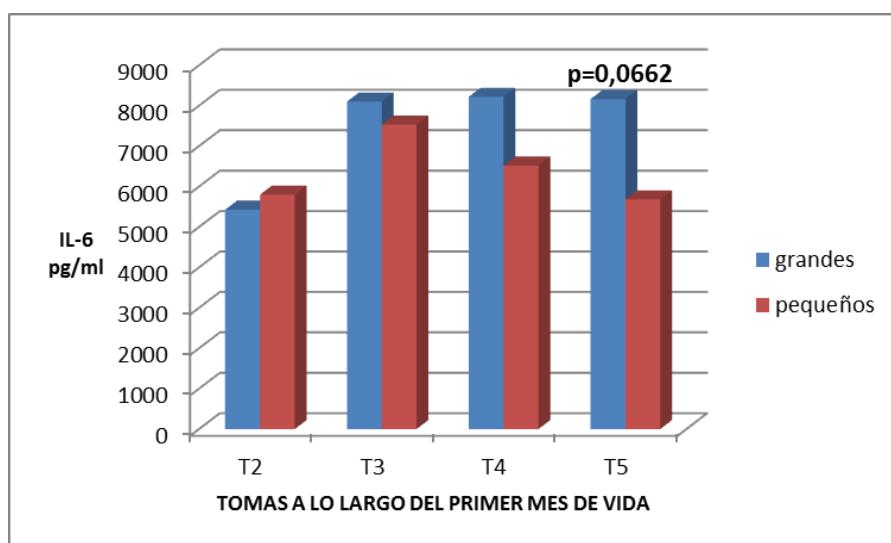
Efecto del sexo y del peso al nacimiento

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica de IL-6 en función del sexo como se puede ver en la tabla 4.

Tabla 2. Efecto del sexo en la concentración de IL-6 (pg/ml).

	Hembras	Machos	Valor de p
T2	6135 ± 3134	5160 ± 2498	0,5557
T3	7839 ± 1888	7958 ± 2694	0,7237
T4	7848 ± 2287	7523 ± 2583	0,8137
T5	7490 ± 1592	7232 ± 3251	0,7237

En cuanto al peso al nacimiento tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) como se puede observar en la gráfica 4. En el momento T5 se ve una mayor concentración de IL-6 en corderos nacidos con más de 3,5 kg, sin embargo el valor de p resultó ligeramente mayor de 0,05 por lo cual no es estadísticamente significativo.



Gráfica 2. Valores medios de concentración sérica de IL-6 según el peso a los largo del primer mes de vida (pg/ml).

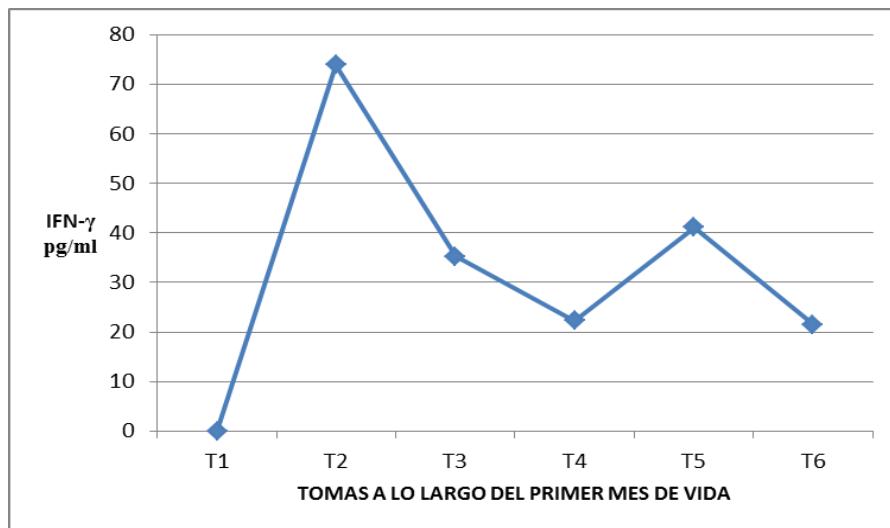
IFN- γ

Variación de la concentración sérica de IFN- γ en el primer mes de vida

La citocina no fue detectada en suero de los animales antes de tomar calostro (T1). En la tabla 5 podemos ver los resultados de la estadística descriptiva perteneciente a los sueros de corderos sanos de los momentos T2, T3, T4, T5 y T6. Como se puede observar en la gráfica 5 en el momento T2 se alcanzó la mayor concentración sérica de IFN- γ y posteriormente tiene una tendencia a ir bajando. En el momento T5 sube de nuevo para bajar otra vez en el momento T6.

Tabla 5. Valores de IFN- γ (pg/ml) en suero de corderos sanos durante el primer mes de vida

	Media	Desv. estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
T2	73,857	121,37	38,38	2,8	386,8
T3	35,214	14,607	14,607	2,935	111,21
T4	22,315	15,502	4,299	1,73	52,69
T5	41,085	39,923	10,308	2,495	133,56
T6	21,534	13,936	4,202	3,15	49,73



Gráfica 5. Evolución de la concentración sérica de IFN- γ en corderos sanos durante el primer mes de vida (pg/ml).

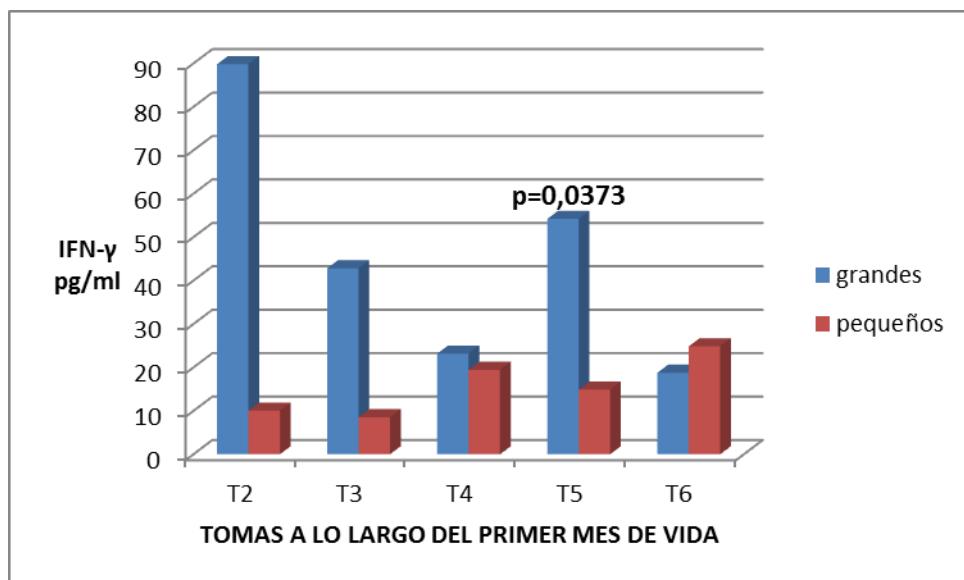
Efecto del sexo y del peso al nacimiento

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) con respecto al sexo dentro de cada una de las tomas. Los valores de p para todos los momentos fueron superiores a 0,05 como se puede apreciar en la tabla 6.

Tabla 6. Efecto del sexo en la concentración de IFN- γ (pg/ml).

	Hembras	Machos	Valor de p
T2	$68,115 \pm 76,338$	$77,685 \pm 151,574$	0,8312
T3	$53,673 \pm 50,095$	$25,985 \pm 41,977$	0,7963
T4	$14,047 \pm 11,363$	$27,482 \pm 16,088$	0,1432
T5	$51,902 \pm 39,871$	$33,874 \pm 40,613$	0,3458
T6	$16,056 \pm 4,832$	$24,664 \pm 16,750$	0,3447

En cuanto al peso al nacimiento, como se muestra en la gráfica 6, parecía que había una tendencia a que los animales con mayor peso tuvieran valores más elevados pero solo se encontró una diferencia significativa en la toma T5 ($p=0,0373$). En el momento T2 la diferencia fue muy grande, pero sin llegar a ser estadísticamente significativa ($p>0,05$).



Gráfica 6. Valores medios de concentración sérica de IFN- γ según el peso a lo largo del primer mes de vida (pg/ml).

Correlación entre niveles de citocinas en corderos sanos

No se encontró correlación positiva y significativa entre las concentraciones séricas de IFN- γ y las concentraciones séricas de las otras dos citocinas estudiadas.

En el caso de la correlación entre IL-6 e IL-1 β se encontró que sí que había una correlación positiva en todas las tomas salvo en la toma T2 como se muestra en la tabla 7, siendo mucho mayor en los momentos T4 y T5.

Tabla 7. Valores de rho y p para establecer la correlación entre las concentraciones de IL-6 e IL-1 β en las distintas tomas.

	rho	p
T2	0,161	0,5476
T3	0,632	0,0286
T4	0,943	0,0007
T5	0,908	0,0011

CORDEROS ENFERMOS

IL-1 β

En la tabla 8 se muestran los valores medios de IL-1 β para las explotaciones A y B y comparado con los animales sanos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) cuando se compararon los valores de los animales enfermos con valores de los corderos sanos de la misma edad.

Tabla 8. Medias y desviaciones estándar de concentraciones de IL-1 β de las explotaciones A y B, y comparación de dichos valores respectivamente con las tomas T4 y T5.

	Media±SD	Valor p
Explotación A	3867±1533	0,0431
T4	1630±580	-
Explotación B	3649±727	0,0180
T5	1612±583	-

IL-6

En la tabla 9 se muestran los valores medios de IL-6 en corderos enfermos de las explotaciones A y B. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los animales enfermos y los sanos. Sin embargo, podemos ver que en el caso de la explotación B el valor de $p=0,063$ estuvo muy próximo a ser estadísticamente significativo.

Tabla 9. Medias y desviaciones estándar de concentraciones de IL-6 de las explotaciones A y B, y comparación de dichos valores respectivamente con las tomas T4 y T5.

	Media±SD	Valor p
Explotación A	8012±2897	0,315
T4	7653±2389	-
Explotación B	8206±2189	0,0630
T5	7336±2639	-

IFN-γ

En la tabla 10 se muestran los valores medios de IFN-γ en los corderos enfermos de diarrea de las explotaciones A y B. Al comparar los valores de IFN-γ en los animales enfermos con los corderos sanos en los tiempos T4 y T5 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) según un análisis no paramétrico.

Tabla 10. Medias y desviaciones estándar de concentraciones de IFN-γ de las explotaciones A y B, y comparación de dichos valores respectivamente con las tomas T4 y T5.

	Media±SD	Valor p
Explotación A	15,291±5,25	0,593
T4	22,315±15,502	-
Explotación B	25,431±33,32	0,398
T5	41,085±39,923	-

Correlación entre niveles de citocinas en corderos enfermos

Se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa ($p<0,05$) entre los niveles de IL-6 e IL-1 β en animales enfermos, sin embargo, no se halló esta correlación ($p>0,05$) de UL-6 e IL-1 β con los valores de IFN- γ como podemos ver en la tabla 11.

Tabla 11. Valores de rho y p para establecer la correlación entre las concentraciones de las distintas citocinas.

	rho	p
IL-6/IL-1β	0,776	0,010
IL-6/IFN-γ	0,218	0,4902
IFN-γ/IL-1β	0,188	0,5730

6. DISCUSIÓN

Aunque se han realizado estudios en los que se determina la expresión de genes de citocinas en corderos (Entrican et al. 1998; Craig et al. 2007) o se valora el efecto de citocinas sobre la circulación de linfocitos hacia los nódulos linfáticos en ovejas (Wee et al. 2011), esta es la primera vez en que se determinan los valores normales y la evolución de la concentración en suero sanguíneo de tres importantes citocinas en corderos desde el momento del nacimiento hasta los 28 días de vida. Nuestro estudio proporciona valores basales de la concentración sérica de citocina IL-1 β , IL-6 e IFN- γ durante el primer mes de vida en una población de corderos de raza Rasa Aragonesa pudiendo servir estos datos como valores de referencia en la especie.

Existen evidencias de la transferencia de citocinas desde el calostro al suero del neonato demostradas en terneros (Yamanaka et al. 2003), en lechones (Nguyen et al. 2007) y en potros (Secor et al. 2012). En estos estudios se establecen las concentraciones basales en estas especies de diferentes citocinas.

En el caso de lechones lactantes (Nguyen et al. 2007), observaron que la IL-6 alcanzaba el pico de concentración entre el día 1 y el 3 posparto (1200-1600 pg/ml) para luego decrecer mientras que en el caso de IFN- γ presentaba el pico entre el día 1 y 2 (600-900 pg/ml) para luego decrecer en su concentración sérica. Estos autores demostraron que el pico de mayor absorción coincidía con el cierre de la barrera intestinal, lo cual impide la absorción de inmunoglobulinas y otras moléculas. Para estos investigadores las concentraciones máximas de citocinas en suero de lechones se debían a la ingestión de las mismas presentes en altas concentraciones en el calostro materno.

En el caso de los terneros (Yamanaka et al., 2003) observaron que IL-1 β alcanzó un pico a las 24 horas del nacimiento (46900 pg/ml) y luego descendió. Igualmente ocurría con IL-6 que a las 24 horas alcanzaba una concentración de 1230 pg/ml para descender rápidamente después, mientras que en el caso de IFN- γ el pico de concentración se alcanzaba a las 12 horas (190 pg/ml) y se mantenía hasta las 24 horas para luego descender.

En los dos estudios anteriores referentes a terneros y lechones, la concentración de citocinas antes de comenzar la toma de calostro estaba por debajo del límite de detección del test usado en cada protocolo, como ocurre en el momento T1 de nuestro

estudio para cada una de las tres citocinas estudiadas (límite de detección del test 5 pg/ml).

En nuestro experimento observamos, del mismo modo que en los estudios anteriormente citados, cómo se alcanzó un pico de concentración en las tres citocinas al comienzo de la toma de calostro para luego comenzar a descender progresivamente, salvo en el caso de IL-6 que se mantuvo en una concentración bastante elevada hasta los 18 días. En el caso de IFN- γ ese pico se alcanzó a las 24 horas tras el nacimiento con una concentración media de 78 pg/ml, en IL-6 aparece un poco más tarde en el momento T3 con 7910 pg/ml y en IL-1 β también aparece en el momento T3 con 5234 pg/ml.

El origen de las citocinas en el suero sanguíneo de los recién nacidos se debe a la ingestión de las mismas a partir del calostro y leche maternas. Ese hecho se ha demostrado en ganado porcino (Nguyen et al. 2007), en ganado bovino (Hagiwara et al. 2000; Yamanaka et al. 2003), en équidos (Burton et al. 2009) y en niños recién nacidos (Castellote et al. 2011). Se ha demostrado también la correlación entre los niveles de citocinas del calostro y de la leche con los niveles séricos de citocinas de la madre (Nguyen et al. 2007) así como una correlación entre las concentraciones de citocinas en el calostro y las concentraciones séricas del potro neonato que está ingiriendo dicho calostro (Secor et al. 2012). Nosotros no hemos analizado los niveles de citocinas en el calostro de ovejas ni tampoco están descritos en la literatura veterinaria estos valores. Probablemente, como ocurre en otras especies, el origen y la evolución de la concentración de citocinas séricas en corderos depende fundamentalmente del calostro de sus madres.

En base a nuestros resultados y los estudios anteriormente realizados por otros grupos de investigación ya citados, podemos comprobar que efectivamente es a las pocas horas de comenzar la toma de calostro cuando los niveles de citocinas en suero sanguíneo de corderos sanos comienzan a ser detectables. Esto coincide con las hipótesis de otros investigadores que lo atribuyen al paso de las citocinas desde el calostro al sistema circulatorio del neonato mediante la absorción intestinal durante las primeras horas después del parto coincidiendo con el periodo de tiempo anterior al cierre de la barrera intestinal a las inmunoglobulinas y otras moléculas (Tizard 2009).

En cuanto al efecto del sexo sobre los valores de las tres citocinas estudiadas no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa. Tampoco hemos encontrado datos con los cuales comparar nuestros resultados en la literatura veterinaria. Estudios realizados en humana han determinado niveles más elevados de IL-1ra, una citocina antagonista que bloquea los efectos biológicos de IL-1, en el líquido amniótico, orina neonatal y suero del cordón umbilical de los recién nacidos hembras con respecto a los machos (Romero et al. 1994; Elsmén et al. 2006), pero no para IL-1 β e IL-6 (Weissenbacher et al. 2012). No conocemos los niveles de estas tres citocinas en sangre de cordón umbilical o líquido amniótico de corderos recién nacidos, y el conocimiento de estos valores podría ser una interesante línea de investigación en un futuro.

Cuando analizamos la variación de la concentración sérica de citocinas en función del peso al nacimiento tampoco encontramos diferencias significativas salvo en el momento T5 para IFN- γ ($p=,0373$) siendo la concentración sérica superior en corderos de mayor tamaño. Sí que observamos una tendencia en las otras citocinas a que en los corderos de mayor tamaño al nacimiento tuvieran concentraciones más elevadas. Consultando la bibliografía, no hemos encontrado trabajos en los que se indiquen los valores de citocinas en relación con el peso al nacimiento. El hecho de que se encontraran diferencias tan solo en el momento T5, con 18 días de vida, es difícil de explicar. En un principio, corderos más grandes ingieren más calostro, pero también la cantidad de citocina se distribuirá en un mayor volumen con lo cual se equilibraría el resultado. Hay que añadir que la división que se hizo entre corderos grandes ($>3,5\text{kg}$) y pequeños ($<3,5\text{kg}$) se hizo en función del criterio del veterinario de la explotación. No habría tampoco que olvidar para explicar este fenómeno la variabilidad materna en cuanto a la concentración de citocinas en calostro. Para determinar exactamente si hay un efecto del peso sobre la concentración sérica de citocinas, habría que realizar lotes de estudio incluyendo los corderos de pesos más bajos y/o prematuros.

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa que apoyara una correlación positiva entre el nivel sérico de IFN- γ y las otras dos citocinas estudiadas en corderos sanos. Sin embargo, sí que se obtuvo una correlación positiva entre IL-1 β e IL-6. El motivo podría explicarse en que estas dos citocinas están más cercanas en actividad y función entre ellas que con IFN- γ . Tanto IL-1 β como IL-6 son citocinas producidas fundamentalmente durante la respuesta inmune innata mientras que IFN- γ se

produce sobre todo durante la respuesta inmune adaptativa (Tizard 2009). Además las dos primeras son producidas principalmente por macrófagos y monocitos mientras que la tercera la producen principalmente células NK, Th1 y LTC. Por otro lado tanto IL-1 β como IL-6 son citocinas pro-inflamatorias que inducen la síntesis de proteínas de fase aguda, principalmente fibrinógeno, y están asociadas a procesos patológicos que conllevan una respuesta inflamatoria sistémica del organismo pues participan activamente en ella (Abbas y Litchman, 2004). Todo esto nos lleva a pensar que la determinación indistinta de IL-1 β o IL-6 puede servir para valorar un proceso patológico en el ganado ovino que conlleve una respuesta inflamatoria del organismo.

En cuanto a los animales enfermos, los niveles de citocinas que presentaban los animales enfermos fueron superiores a los valores de los corderos sanos en el caso de IL-1 β y para IL-6, pero sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de IL-1 β de los corderos enfermos de las granjas A y B comparados con los sanos de su misma edad. Sin embargo, en el caso de IFN- γ , los niveles de citocinas que presentaban los animales enfermos fueron inferiores a los valores de los corderos sanos.

Burton et al. (2009), en su estudio sobre las concentraciones séricas de IL-6 obtuvieron valores significativamente inferiores en potros sanos en comparación con potros sépticos y lo atribuyeron a que éstos potros sépticos lo son debido a que han padecido un fallo de la transferencia de la inmunidad pasiva por un insuficiente o incorrecto aporte de calostro. En nuestro caso, que los valores de IL-1 β e IL-6 en animales enfermos sean significativamente superiores que los de los animales sanos de su misma edad podría ser debido a que estos animales no presentaban un fallo en la transferencia de la inmunidad pasiva (pues fueron correctamente encalostrados) como los potros del estudio de Burton et al. (2009), sino que debido a un proceso patológico presentaban una reacción inflamatoria en la cual participaban activamente estas dos citocinas. Hay estudios en humana que demuestran una elevación significativa de IL-6 en recién nacidos humanos con trastornos intestinales graves (Satar et al. 2008; Lodha et al. 2010) y en general en procesos sépticos. Gold et al. (2007) comprobaron que la expresión de los genes implicados en la secreción de IL-6 era 15 veces superior en potros sépticos que finalmente sobrevivieron a la infección. En la mayoría de los procesos diarreicos en corderos está implicada *E. coli* u otras bacterias. El aumento en las concentraciones de

citocinas observado en nuestros corderos enfermos se provocó posiblemente por la reacción del sistema inmunitario de los corderos frente al agente patógeno. Esto concuerda con otros estudios como el de Kabaroff et al. (2006) donde comprobaron el aumento de la concentración sérica de IL-6 frente al lipopolisacárido (LPS) bacteriano.

IL-1 β e IL-6 son, junto con IL-1 α , unas de las principales citocinas implicadas en la respuesta inmune innata participando en la síntesis de proteínas de fase aguda y de pirógenos (Abbas y Lichtman, 2004; Tizard, 2009). La elevación de las concentraciones de estas dos citocinas en nuestros corderos afectados de diarrea estaría indicando la presencia de una reacción inflamatoria sistémica debida a proceso septicémico o inflamatorio. Existen estudios realizados en humanos adultos y niños en los cuales se asocian niveles elevados de IL-6 con infección y con un mayor riesgo de morir durante la hospitalización (Buck et al. 1994; Harris et al. 2005). Para estos autores, la elevación de IL-6 podría servir como marcador precoz de infección y como indicador de la evolución y la gravedad del proceso.

Cuando estudiamos la correlación entre las citocinas de animales enfermos vemos de nuevo una correlación positiva y estadísticamente significativa entre IL-1 β e IL-6 mientras que la correlación de estas dos citocinas con IFN- γ no resulta estadísticamente significativa en ambos casos. Esto es debido a que, como hemos dicho en el caso de los corderos sanos, IL-1 β e IL-6 son producidas durante la respuesta inmune innata, las dos intervienen en la síntesis de proteínas de fase aguda y son producidas por los mismos tipos celulares. Sin embargo, IFN- γ es producido por otros tipos celulares durante la respuesta inmune adaptativa (Abbas y Lichtman, 2004; Tizard, 2009). Esta correlación también se ha demostrado en ganado porcino (Nguyen et al. 2007), en suero de cordón umbilical de recién nacidos humanos (Takahashi et al. 2010) y en el calostro de mujeres (Zanardo et al. 2007).

En conclusión, hemos establecido los niveles séricos basales de IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en nuestra población de corderos sanos durante el primer mes de vida y hemos comparado estos resultados con los niveles séricos de estas tres citocinas en suero corderos enfermos de la misma edad que presentaban diarrea. Las concentraciones séricas de IL-6 e IL-1 β están elevadas en los corderos con diarrea y esto se explica porque estas citocinas están implicadas en la respuesta inmune innata del organismo. Además sus

concentraciones séricas están correlacionadas positivamente y podrían utilizarse como indicadores de procesos patológicos que conlleven una respuesta inflamatoria. Se necesitan nuevos estudios con un número mayor de animales para establecer el valor predictivo que pueden tener estas citocinas en la mortalidad o la morbilidad en corderos.

7. CONCLUSIONES

1. La concentración de citocinas IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en el suero del cordero durante su primer mes de vida sigue un patrón similar al de otras especies animales. Antes de la toma de calostro estas citocinas no son detectables en el animal y se adquieren a través del calostro materno incrementando rápidamente su concentración durante las primeras horas de vida para bajar después suavemente.
2. Los niveles basales de las tres citocinas estudiadas, como ocurre en otras especies, presentan una gran variabilidad lo que dificulta su utilización como parámetros de referencia.
3. Existe correlación positiva entre IL-1 β e IL-6 tanto en los animales sanos como en los enfermos, pero no la hay con IFN- γ . IL-1 β e IL-6 son citocinas proinflamatorias producidas durante la respuesta inmune innata que participan en la respuesta inflamatoria del organismo. La ausencia de correlación de estas dos citocinas con IFN- γ se debe, posiblemente, a que esta citocina es producida por otros tipos celulares y participa en otro tipo de respuesta inmune.
4. Las concentraciones de IL-1 β e IL-6 de los animales con diarrea fueron más elevadas que las de los corderos sanos de la misma edad. Esto se debe a que estas dos citocinas participan activamente en la respuesta inmune innata.
5. El aumento de los niveles de IL-1 β e IL-6 en corderos diarreicos sugiere que en estos animales se produjo una respuesta inflamatoria. El análisis de cualquiera de estas dos citocinas podría ser utilizado como marcador frente a procesos patológicos que impliquen una respuesta inflamatoria del organismo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2004) Inmunología Celular y molecular. Elsevier España. Sexta edición, Barcelona, España.
- Alluwaimi A.M. (2004). The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. Res.Vet. Sci., 77: 211-222.
- Buck C., Bundschu J., Gallati H., Bartmann P., Pohlandt F. (1994). IL-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. Pediatrics. 93: 54-58.
- Burton A.B., Wagner B., Erb H.N., Ainsworth D.M. (2009). Serum interleukin-6 and IL-10 concentrations in normal and septic foals. Vet. Immunol. Immunopathol., 132: 122-128.
- Castellote C., Casillas R., Ramírez-Sanatana C., Perez-Cano F.J., Castell M., Moretones M.G., López-Sabater M.C., Franch A. (2011). Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. J. Nutr., 141: 1181-1187.
- Craig N.M., Miller H.R.P., Smith W.D., Knight P.A. (2007). Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. Vet. Immunol. Immunopathol. 120: 47-54.
- Elsmén E., Ley D., Cilio CM., Hausen-Pup P., Hellstrom-Wetos L. (2006). Umbilical cord levels of interleukin 1 receptor antagonist and neonatal outcome. Biol. Neonate. 89(4): 220-226.
- Entrican C., Brown J., Graham S. (1998). Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 21: 15-26.
- Gold J.R., Perkins G.A., Erb H.N., Ainsworth D.M. (2007). Cytokines profiles of peripheral mononuclear cells isolated from septic and healthy neonatal foals. J. Vet. Intern. Med., 21: 482-488.
- Hagiwara K., Kataoka S., Yamanaka H., Kirisawa R., Iwai H. (2000). Detection of cytokines in bovine colostrum. Vet. Immunol. Immunopathol., 76: 183-190.

- Harris M.C., D'Angio C.T., Gallagher P.R., Kaufman D., Evans J., Kilpatrick L. (2005). Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J. Pediatr.*, 147: 462-468.
- Kabaroff L.C., Rodríguez A., Quinton M., Boermans H., Karrow N.A. (2006). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 113:113-124.
- Lodha A., Asztalos E., Moore A.M. (2010). Cytokine levels in neonatal necrotizing enterocolitis and long-term growth and neurodevelopment. *Acta Paediatrica*, 99: 338-343.
- Nguyen T., Yuan L., Azevado M.S.P., Jeong K., Gonzalez A.M., Saif L.J. (2007). Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 117:236-248.
- Romero R., Gómez R., Galasso M., Mazar M., Berry S.M., Quintero R.A., Cotton D.B. (1994). The neonatal interleukin 1 receptor antagonist in the fetal, maternal and amniotic fluid compartments: the effect of gestational age, fetal gender and intrauterine infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 171(4):912-921.
- Rudloff H.E., Schmalstieg Jr. F.C., Mushtaha A.A., Palkowetz K.H., Liu S.K., Goldman A.S. (1992). Tumor necrosis factor-alpha in human milk. *Pediatr. Res.* 30: 29-33.
- Rudloff H.E., Schmalstieg Jr. F.C., Palkowetz K.H., Paszkiewicz E.J., Goldman A.S. (1993). Interleukin-6 in human milk. *J. Reprod. Immunol.* 23: 13-20.
- Satar M., Turhan E., Yapıcıoglu H., Narlı N., Ozgunen F.T., Çetiner S. (2008). Cord blood cytokine levels in neonates born to mothers with prolonged premature rupture membranes and its relationship with morbidity and mortality. *Eur. Cytokine Netw.*, 19: 37-41.
- Scheerlink J.P.Y., Yen H.H. (2005). Veterinary applications of cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108:17-22.
- Secor E.J., Matychak M.B., Felipe M.J.B. (2012). Transfer of tumour necrosis factor-alfa via colostrum to foals. *Vet. Rec.*, 170: 51.

Sullivan J.S., Kilpatrick L., Costarino Jr. A.T., Lee S.C., Harris M.C. (1992). Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J. Pediatrics.*, 120:510-515.

Takahashi N., Uehara R., Kobayashi M., Yada Y., Koike Y., Kawamata R., Odaka J., Honma Y., Momoi M.Y. (2009). Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine*, 49: 331.337.

Tizard I. (2009). Introducción a la Inmunología Veterinaria. Elsevier España. Octava edición, Barcelona, España.

Wee J.L.K., Greewood D.L.V., Han X., Scheerlink J.P.Y. (2011). Inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α regulate trafficking through the local lymph node. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 144: 95-103.

Weissenbacher T.M., Lembender R.P., Witkin S.S., Gingelmaier A., Schiessl B., Kaines F., Jeschke V., Dian D., Karl K. (2012). Influence of maternal age, gestational age and fetal gender on expression of immune mediators in amniotic fluid. *BMC Research Notes*, 5:375.

Yamanaka H., et al. (2003). Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. *Microbiol. Immunol.*, 47: 461-468.

Yamanaka H., et al. (2003). Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrum-fed newborn calves. *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 813-816.

Zanardo V., Gollin R., Amato M., Trevisanuto D., Favaro F., Faggian D., Plabani M. (2007). Cytokines in human colostrum and neonatal jaundice. *Pediatr. Res.*, 62: 191-194.