

Universidad Católica de Santa María
Escuela de Postgrado
Maestría en Producción y Salud Animal



**“EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE
PANETH DEL EPITELIO INTESTINAL DE CUYES (*Cavia porcellus*) EN RECRÍA
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella typhimurium*,
AREQUIPA 2018”**

Tesis presentada por la Bachiller:

Bravo Luna, Wendy Milagros

para optar el grado académico de:

Maestra en Producción y Salud Animal

Asesor:

Dr. Fernández Fernández, Fernando

AREQUIPA, PERÚ

2019

Arequipa, 11 de marzo del 2019

Sr. Dr.
JOSE VILLANUEVA SALAS
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Presente,

De mi consideración,

Es grato dirigirme a usted para dar respuesta a la revisión del Borrador de Tesis con expediente Nro. 201800000051241 presentado por la Bachiller BRAVO LUNA, Wendy Milagros, referido a la Tesis titulada: "EVALUACION MORFOMETRICA Y CUANTIFICACION DE CELULAS DE PANETH DEL EPITELIO INTESTINAL DE CUYES (*Cavia porcellus*) EN RECRÍA, INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella typhimurium*, AREQUIPA 2018".

Realizada la revisión del borrador de tesis y luego de haber levantado las observaciones:

El borrador de tesis se encuentra apto para sustentación y defensa.

Atentamente.



Dr. Fernando Fernández Fernández.

Jurado



DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 19 de marzo del 2019

Sr. Dr.
Dr. PhD. José Antonio Villanueva Salas
Director de la Escuela de Postgrado
Universidad Católica de Santa María
Presente.-

REFERENCIA: Nombramiento de Jurado Dictaminador Nro. 244

Tengo a bien dirigirme a Ud. Para saludarlo y a la vez para informar sobre el Dictamen del Borrador de Tesis para optar el Grado Académico de Maestro Titulado: **EVALUACION MORFOLOGICA Y CANTIFICACION DE LAS CELLAS DE PANETH DEL EPITELIO INTESTINAL DE CUYES (*Cavia porcellus*) EN RECRIA INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella typhimurium* AREQUIPA-2018**; presentado por el Br. BRAVO LUNA, Wendy Milagros, a fin de hacer conocer lo siguiente:

Que, habiendo revisado el referido Borrador de Tesis se procedió a realizar las observaciones correspondientes y estas fueron subsanadas, por lo tanto se encuentra APTO PARA SUSTENTACION.

Sin otro particular aprovecho la oportunidad para reiterar los sentimientos de mi especial estima.



Dr. Víctor Pacheco Sánchez
Miembro del Jurado Dictaminador



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA ESCUELA DE POST-GRADO

DICTAMEN PASE A SUSTENTACIÓN

Arequipa, 11 de Marzo del 2019

Señor Doctor:
José Villanueva Salas
Director de la Escuela de Postgrado
Universidad Católica de Santa María
Presente.-

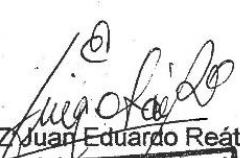
REFERENCIA: BOLETA DE NOMBRAMIENTO DE JURADO DICTAMINADOR N° 244 BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO

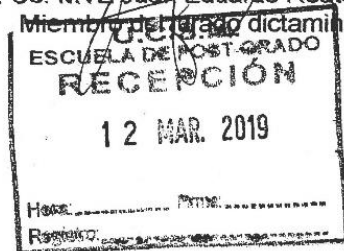
Tengo a bien dirigirme a usted, en relación al borrador de tesis presentado para optar el grado de maestro en Producción y Salud Animal, titulada: **“Evaluación morfométrica y cuantificación de las células de Paneth del epitelio intestinal de cuyes (*Cavia porcellus*) en recría infectados experimentales con salmonella entérica Typhimurium, Arequipa 2017”** presentado por la Bach. Bravo Luna, Wendy Milagros, a fin de hacer conocer lo siguiente:

En merito a la evaluación de las observaciones del borrador en mención una vez subsanadas las observaciones procede al desarrollo del borrador final y **pase a sustentación.**

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para expresarle los sentimientos de mi mayor consideración.

Atentamente

Dr. Cs. MVZ  Juan Eduardo Reátegui Ordóñez
Miembro del jurado dictaminador



DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mi Papá Willy, por su apoyo incondicional en mi vida profesional dándome aliento para seguir con la presente tesis y por ser un signo de superación en mi vida.

A mi Mamá Consuelo, por la constante preocupación que impregna en mi vida profesional y por enseñarme la constancia.

A mi Hermana Jacqueline, por ser mi fiel amiga, quien siempre está conmigo a pesar de la distancia, apoyándose incondicionalmente.

A mis amigos, por brindarme su amistad sincera incondicional siempre.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiarme en este camino que emprendí y ser mi fortaleza en todo momento.

A la Universidad Católica de Santa María, por formarme e inculcarme los valores para ser una profesional, gracias a mi alma Mater.

A mi Asesor Dr. Fernando Fernández Fernández, por todo el apoyo y tiempo brindado, guiando y orientándome en la presente tesis.

Al Dr. Víctor Pacheco Sánchez y al Dr. Juan Reátegui Ordoñez, por su tiempo y guía como jurados en la presente tesis.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS.....	75

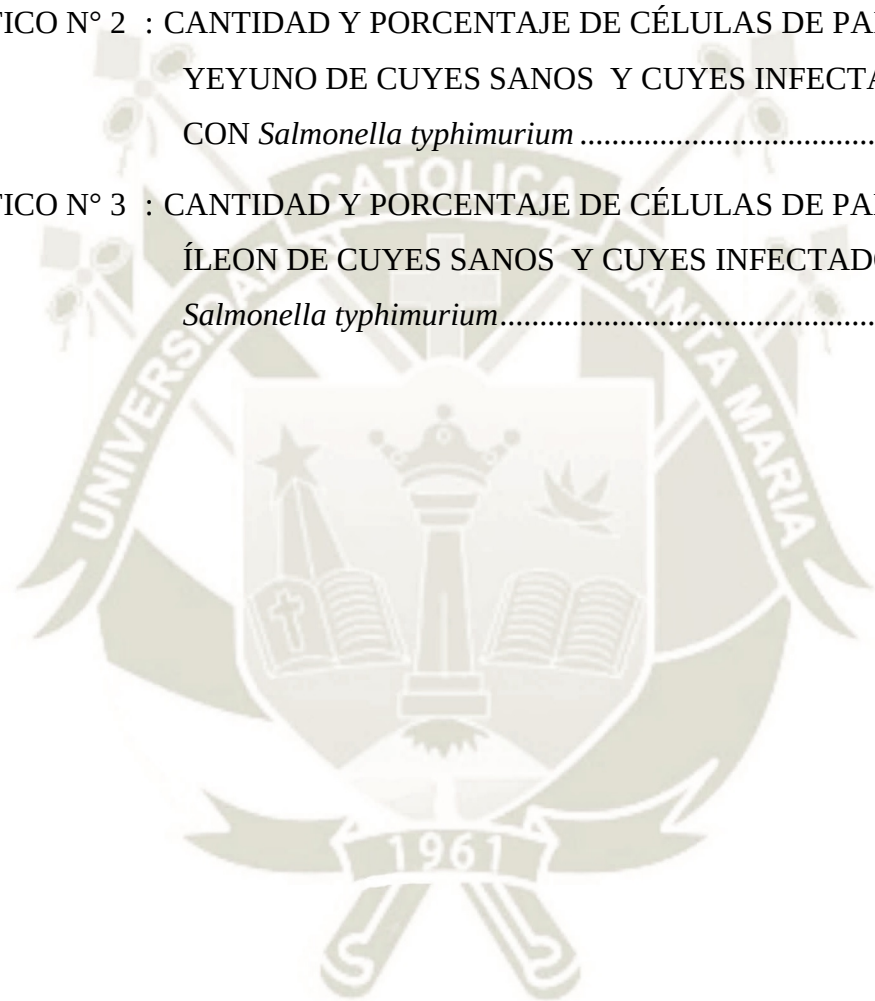
ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

TABLA N° 1 : CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA-DUODENO-CUYES SANOS.....	50
TABLA N° 2 : CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA- DUODENO - CUYES ENFERMOS EXPERIMENTALMENTE	51
TABLA N° 3 : INCREMENTO DE CÉLULAS DE PANETH EN DUODENO DE CUYES SANOS	52
TABLA N° 4 : CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA –YEYUNOS- CUYES SANOS.....	53
TABLA N° 5 : CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA - YEYUNO -CUYES ENFERMOS EXPERIMENTALMENTE	54
TABLA N° 6 : INCREMENTO DE CÉLULAS DE PANETH EN YEYUNO DE CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS CON <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	55
TABLA N° 7 : CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA DE ÍLEON DE CUYES SANOS.....	56
TABLA N° 8 : CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA - ÍLEON - CUYES ENFERMOS EXPERIMENTALMENTE	57
TABLA N° 9 : INCREMENTO DE CÉLULAS DE PANETH EN ÍLEON DE CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS CON <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	58
TABLA N° 10 : DATOS ESTADÍSTICOS DUODENO CUYES SANOS Y ENFERMOS	90
TABLA N° 11 : DATOS ESTADÍSTICOS YEYUNO CUYES SANOS Y ENFERMOS	91
TABLA N° 12 : DATOS ESTADÍSTICOS ÍLEON CUYES SANOS Y ENFERMOS	92

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
GRÁFICO N° 1 : CANTIDAD Y PORCENTAJE DE CÉLULAS DE PANETH EN DUODENO DE CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS CON <i>Salmonella typhimurium</i>	93
GRÁFICO N° 2 : CANTIDAD Y PORCENTAJE DE CÉLULAS DE PANETH EN YEYUNO DE CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS CON <i>Salmonella typhimurium</i>	94
GRÁFICO N° 3 : CANTIDAD Y PORCENTAJE DE CÉLULAS DE PANETH EN ÍLEON DE CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS CON <i>Salmonella typhimurium</i>	95



RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue evaluar morfológicamente y cuantificar las células de Paneth del epitelio intestinal de cuyes (*Cavia porcellus*) en recría infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurim*, para lo cual, se utilizaron 16 cuyes: A 24 días de edad se infectaron a 8 animales vía oral con una dosis de 10^9 - 10^{12} UFC de *Salmonella typhimurium* y se utilizaron 8 cuyes como grupo control. Se tomaron 48 muestras a partir de duodeno, yeyuno e íleon, comprendidos entre hembras y machos al momento de la muerte del animal (entre 28-39 días de edad) de la línea 1, posteriormente fueron fijadas en formol al 10%; para luego ser procesadas y coloreadas con tres tinciones distintas: Hematoxilina – Eosina, PAS y Lendrum. Se obtuvieron mejores resultados para la observación de células de Paneth con la tinción de Lendrum, motivo por el cual, ésta fue la única evaluada. La evaluación estadística fue realizada mediante la prueba de t de Student con un nivel de significancia del 5%; dando como resultado que, la cantidad de células de Paneth en el duodeno, yeyuno e íleon en cuyes enfermos experimentalmente presentaron diferencia estadística. Se evidenció un incremento de células de Paneth en el caso de duodeno de cuyes sanos e infectados experimentalmente de 140 células de Paneth, en el caso de yeyuno de cuyes sanos e infectados experimentalmente de 41 células de Paneth y por último en el íleon de cuyes sanos e infectados experimentalmente de 89 células de Paneth dando como resultado final que la morfología de las Células de Paneth en cuyes sanos y enfermos no se ve alterada excepto en el aumento de gránulos presentes en dichas células. La cantidad de células de Paneth aumenta en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurium* en comparación a cuyes sanos.

Palabras Clave: Cuyes, Duodeno, Yeyuno, Íleon, Células Paneth, *Salmonella typhimurim*.

ABSTRACT

The aim of the present thesis was to evaluate morphologically and quantify the Paneth cells of the intestinal epithelium of Guinea pigs (*Cavia porcellus*) in rearing experimentally infected with *Salmonella typhimurim*, for which, 16 Guinea pigs were used: At 24 days of age they were infected at 8 animals orally with a dose of 10^9 - 10^{12} CFU of *Salmonella typhimurium* and 8 Guinea pigs were used as a control group. 48 samples were taken from the duodenum, jejunum and ileum, included between females and males at the time of death of the animal (28-39 days of age) of line 1, later they were fixed in 10% formaldehyde and then processed and stained with three different stains: Hematoxylin - Eosin, PAS and Lendrum, better results were obtained for the observation of Paneth cells. With the Lendrum stain, reason why this was the only one evaluated. The statistical evaluation was performed using the Student's t-test with a level of significance of 5%; As a result, the number of Paneth cells in the duodenum, jejunum and ileum in experimentally infected Guinea pigs showed statistical difference. An increase of Paneth cells was evidenced in the case of the duodenum of healthy and experimentally infected Guinea pigs of 140 Paneth cells, in the case of the healthy and experimentally infected Guinea pigs of 41 cells of Paneth and finally in the ileum of healthy Guinea pigs. And experimentally infected of 89 cells of Paneth, giving as a final result that the morphology of the Paneth cells in healthy and diseased Guinea pigs is not altered except in the increase of granules present in said cells. The number of Paneth cells increases in Guinea pigs experimentally infected with *Salmonella typhimurium* compared to healthy Guinea pigs.

Keywords: Cuyes, Duodenum, Jejunum, Íleon, Paneth cells, *Salmonella typhimurim*.

INTRODUCCIÓN

“La Salmonelosis es una importante zoonosis causada por enterobacterias del género *Salmonella*. Siendo *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* la que se aísla con mayor frecuencia en animales de sangre caliente, de la cual se han descrito más de 1.500 serotipos. Los serotipos son grupos de individuos dentro de una misma especie o subespecie que presentan estructuras antigénicas comunes. La identificación del serotipo se realiza mediante el uso de antisueros que reconocen los antígenos somáticos (O) y flagelares (H)” [1].

“El cuy (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú; ha sido explotado en cautiverio en muchos países latinoamericanos, donde constituye una fuente alimenticia y económica importante” [2]. “La salmonelosis es la enfermedad más importante que afecta a los cuyes en nuestro país, causando índices de morbilidad de 52.7% y de mortalidad 95%. La enfermedad se disemina rápidamente, manteniéndose como enzootias, se presenta principalmente como un cuadro agudo septicémico, muriendo los animales dentro de las 24 a 48 horas. Asimismo, puede ser también de carácter crónico; la enfermedad se puede manifestar de manera variada, desde gastroenteritis auto limitante, severa gastroenteritis, septicemias, abortos, meningitis, enfermedades respiratorias, enfermedades cardíacas, osteomielitis y otras infecciones locales” [3]. “Los cuyes son muy susceptibles a la Salmonelosis; infección que tanto en la forma aguda como crónica ocasiona elevada mortalidad y morbilidad en estas poblaciones” [2, 4, 5]. “En las colonias de cobayos de laboratorio, *Salmonella* ser. *typhimurium* es el serotipo más común; también han sido reportados los serotipos *Salmonella* ser. *enteritidis*, *Salmonella* ser. *weltevreden* y *Salmonella* ser. *poona*.” [6, 7]. “La infección se relaciona con estrés, malas prácticas de manejo y niveles deficientes de bioseguridad, como la presencia de roedores y aves, y el ingreso no controlado del personal que favorece la contaminación de ambientes y alimentos” [2, 4]. “Las variaciones de temperatura y humedad también son predisponentes” [8].

“Los signos clínicos de la Salmonelosis en cobayos incluyen: debilidad, anorexia, abdomen inflamado, pelo hirsuto, diarrea, abortos, infertilidad, parálisis de las extremidades posteriores y caquexia” [9].

“El diagnóstico de la enfermedad se hace mediante el aislamiento e identificación de la bacteria. En los animales sintomáticos, la bacteria *Salmonella enterica* se aísla con mayor

frecuencia a partir del bazo e hígado [9]”. “Los animales que se recuperan de la infección pueden convertirse en portadores, eliminando salmonelas intermitentemente en las heces.

El mantenimiento de la homeostasis intestinal está dado por factores, tales como el pH intestinal, secreción de electrolitos, mantenimiento de la microflora intestinal, procesos absorbivos y digestivos. La barrera de defensa a nivel intestinal tiene componentes celulares propios, como las células de Paneth, células caliciformes, células neuroendocrinas y las células propias del sistema inmune asociado al intestino; lo cual constituye parte de la defensa inmune innata del tracto gastrointestinal.

Las células de Paneth protegen y mantienen la flora intestinal en equilibrio a través de la secreción de proteínas y péptidos antimicrobianos como las lisozimas, defensinas y fosfolipasa A2 secretoria [10]”.

“El contenido de los gránulos de las Células de Paneth posee acción antimicrobiana y tiene un papel en la inmunidad innata local, tales como protección de las células madre de las criptas, control de la composición de la flora endógena, participación en el desarrollo y formación de la cripta y también en los procesos de fagocitosis, digestión y detoxificación” [11,12,13]. “Los gránulos secretorios de las células de Paneth contienen lisozimas, α -defensinas y fosfolipasa A2 secretora” [14,15].

Por lo que, se hace necesario evaluar morfológicamente y cuantificar las células de Paneth en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurium*.

HIPÓTESIS:

Dado que, existe relación directamente proporcional entre infecciones entéricas con presencia de Células de Paneth, es posible que en una infección experimental causada por la bacteria *Salmonella typhimurim*, existan cambios morfológicos y cuantitativos entre células de Paneth de cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurim*.

OBJETIVO:

1. Evaluar la morfología de las células de Paneth del epitelio intestinal de cuyes (*Cavia porcellus*) en recría infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurim*.
2. Cuantificar las células de Paneth del epitelio intestinal de cuyes (*Cavia porcellus*) en recría infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurim*.



**CAPÍTULO I:
MARCO TEÓRICO**

1. Importancia

“El cuy (*Cavia porcellus*), es una especie versátil presentando utilidades diversas como: animal de experimentación, mascota, fuente de proteína animal; esta última muy difundida en el Perú y países andinos (Colombia, Ecuador, y Bolivia), convirtiéndose en una fuente de vital importancia nutricional para muchas familias (crianza familiar) e importancia económica (crianza familiar-comercial y crianza comercial). Líneas nativas y razas obtenidas por mejoramiento genético son utilizadas para la producción comercial, aunque las líneas nativas corresponden a animales pequeños con parámetros productivos pobres en comparación con líneas mejoradas o razas obtenidas (Perú, Inti, Andina); estos son capaces de transmitir adaptabilidad y resistencia a enfermedades. La línea de mascotas es inapropiada para la producción, pues se caracteriza por pobre crecimiento y baja productividad” [16].

“Actualmente, se encuentra con enormes posibilidades de constituirse en una actividad económica capaz de permitir utilidades comparativamente superiores a las generadas por otras actividades pecuarias. La creciente demanda de su carne, la disponibilidad de una nueva oferta tecnológica que en los últimos años permitió importantes avances en el mejoramiento genético; permitieron al cuy, ser una especie eficiente en la conversión de alimentos, precoz y extraordinariamente prolífico; todo ello permite vislumbrar nuevas perspectivas de desarrollo competitivo de esta especie en los mercados regionales y a nivel nacional. Sin embargo, aún se requiere mejorar el sistema de crianza en especial el control sanitario, lo cual es el factor principal que limita el desarrollo poblacional de las granjas familiar-comercial y comerciales” [17].

1.1. Razas o Líneas

“El Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) y otras instituciones dedicadas a la investigación en el sector pecuario, han desarrollado razas y líneas comerciales de cuyes entre las que destacan las siguientes:

- **Perú**

Son animales mejorados, seleccionados por su precocidad y prolificidad, pudiendo alcanzar el peso de comercialización a las nueve semanas, con un índice de conversión alimenticia de 3.81 en óptimas condiciones. Tienen en promedio 2.8 crías por parto, son de pelaje corto y lacio (tipo uno), de color Alazán (tonalidad roja) puro o combinado con blanco. Predominando los de

color alazán, llegando a pesar de 2.8 a 3 kg como máximo. El cuy Perú, es un animal económico, no tanto por su tamaño sino porque, como ya se dijo puede lograr rápidamente un peso de comercialización; es decir 1 kg de peso vivo a los dos meses de edad mientras que otros necesitan cuatro meses o más” [18].

- **Andina**

“Estos animales son generalmente de color blanco, seleccionados por su prolificidad, y su mayor frecuencia de presentación de celo post parto (84%) en comparación con otras líneas; obteniendo un mayor número de crías por intervalo de tiempo (3.9 crías por parto). Esta raza se obtuvo a través de una selección de una población cerrada de cuyes procedentes de ecotipos de la Sierra Norte. Se adapta a los ecosistemas de costa, sierra y selva alta, desde el nivel del mar hasta los 3,500 msnm. Presenta problemas reproductivos en climas con 28 °C o más” [19].

- **Inti**

“Esta línea se caracteriza tanto por ser de doble propósito, como por tener un gran potencial para la sierra, por su rusticidad y adaptabilidad a la altura. Alcanzan un promedio de 800 g a las 10 semanas de edad, con una prolificidad de 3.2 crías por parto” [19].

- **Inca**

“Luego de años de investigación, el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA) presentó una nueva variedad de cuy denominada Inca, la cual puede tener un mayor número de crías por parto e importantes cualidades de tipo productivo. Su introducción promete aumentar la producción de esta especie en las diversas granjas que se dedican a su crianza” [18].

“La Estación Experimental Agraria (EEA) Baños del Inca de Cajamarca, tras evaluar cuyes de esa región, así como de La Libertad y Amazonas, consiguieron esta variedad cuya característica más resaltante es su alta capacidad reproductiva. Cada hembra puede obtener en promedio unas 3.3 crías por parto en los valles interandinos. Otra cualidad importante es la habilidad materna de esta especie que puede mantener una alta tasa de sobrevivencia de sus crías, y con ello reducir las pérdidas económicas de los criadores. Las hembras también

presentan una tasa probada de fertilidad de 98% y pueden tener, según los expertos, hasta un promedio 3.5 partos por año” [20].

- **Criolla**

“En los países andinos, abundan los cuyes nativos y/o criollos que son animales pequeños rústicos con bajos niveles productivos, pero que usados junto con líneas mejoradas producen cuyes con mayores índices de prolificidad y precocidad” [19].

- **Línea Mantaro**

“Desarrollada por INIA Santa Ana se caracteriza por presentar una roseta en la cabeza, pelaje lacio, prolificidad y precocidad en la ganancia de peso” [21].

- **Línea Wanka**

“Desarrollada por la UNCP, caracterizada por su precocidad en el desarrollo, prolificidad, así como su rusticidad. Es la más difundida en el Valle del Mantaro” [21].

- **Líneas Reproductor Genial (RG)**

“Los cuyes RG son una alternativa de mejoramiento genético, como alternativa a múltiples necesidades de la crianza en sistemas comerciales. Los Cuyes RG son cuyes especializados en producción de carne, evidenciado en su alto índice de productividad, se han desarrollado cuatro líneas de abuelos reproductores, dos paternas (Precoz y Cárnica) y dos maternas (Prolífica y Lechera)” [22]. Jiménez y Huamán dijeron que “En una evaluación preliminar se obtuvieron los parámetros de fertilidad del 92%, tamaño de camada de 3.75, sobrevivencia al destete de 85%, número de partos al año de 4.2, y productividad anual referidas a las crías logradas al destete de 12.32. Los cuyes RG fueron desarrollados en la Estación Experimental IVITA El Mantaro, ubicada en el distrito de El Mantaro, provincia de Jauja, región Junín, país Perú; a una altitud de 3,320 msnm.” [22].

“La mortalidad existente en la crianza de cuyes, como consecuencia del desconocimiento de alternativas en el área de salud animal, es lo que limita el desarrollo de la crianza. En los países andinos la crianza de cuyes se realiza de manera tradicional en el sistema familiar. Se viene haciendo esfuerzos a fin de mejorar este sistema difundiendo tecnología apropiada para mejorar su producción, siendo los problemas sanitarios los que producen la mayor merma

de la producción. Los cuyes pueden padecer enfermedades bacterianas, virales, parasitarias y orgánicas; teniendo como causas predisponentes a los cambios bruscos en su medio ambiente, considerando variaciones de temperatura, humedad, exposición directa a corrientes de aire, sobre densidad, falta de limpieza en camas, deficiente alimentación, entre otras” [23].

“Esto hace que esta especie sea susceptible a sufrir enfermedades infecciosas, pudiendo ser ellas de diversa naturaleza. El riesgo de enfermedad es alto, pero factible de ser prevenida con una adecuada tecnología de explotación. La enfermedad, de cualquier etiología, deprime la producción del criadero, traduciéndose en pérdidas económicas para el productor de cuyes” [24].

Según Morales “La salmonelosis es la enfermedad más importante que afecta a los cuyes en nuestro país, causando índices de morbilidad de 52.7% y de mortalidad 95%. La enfermedad se disemina rápidamente, manteniéndose como enzootias, se presenta principalmente como un cuadro agudo septicémico, muriendo los animales dentro de las 24 a 48 horas. Asimismo, puede ser también de carácter crónico; la enfermedad se puede manifestar de manera variada, desde gastroenteritis auto limitante, severa gastroenteritis, septicemias, abortos, meningitis, enfermedades respiratorias, enfermedades cardiacas, osteomielitis y otras infecciones locales” [3].

“La salmonelosis es ocasionada por serotipos del género *Salmonella spp.*, bacilos gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se ha aislado el serotipo *S. typhimurium* en porcentajes que superan el 95%, en relación a otros serotipos” [8]; dos serotipos de los grupos G y E del esquema de Kaufman-White, también han sido encontrados como causantes de la enfermedad.

Según la FAO “Esta enfermedad tiene como vía de infección la oral, siendo la principal fuente de infección los alimentos contaminados, pero podría asumirse que otras vías como la intrauterina y a través de la leche estarían coadyuvando al mantenimiento de la infección; así como el contagio por la introducción de animales de procedencia desconocida; el acceso a los ambientes de crianza de roedores nocivos y aves silvestres en fase de portador que contaminan el alimento con sus deyecciones; el personal que maneja a los animales puede considerarse como transportador cuando pisa el forraje y otros alimentos” [25].

1.2. Fisiología gastrointestinal del cuy

“El cuy es una especie herbívora monogástrica, tiene dos tipos de digestión una enzimática (a nivel del estómago e intestino delgado) y otra microbial (a nivel del ciego) [26]. La fisiología digestiva es un proceso bastante complejo que comprende la ingestión, digestión y la absorción de nutrientes y el desplazamiento de estos a lo largo del tracto digestivo” [26].

“Realiza cecotrofia para reutilizar el nitrógeno, lo que permite un buen comportamiento productivo con raciones de niveles bajos o medios de proteína, este proceso de comportamiento puede ejercer un efecto considerable en los tipos de células y su distribución en las glándulas gástricas, así como variación rítmica y dinámica de las actividades celulares” [27].

“El cuy está clasificado según su anatomía gastrointestinal como fermentador postgástrico debido a los microorganismos que posee a nivel del ciego. El movimiento de la ingesta a través del estómago e intestino delgado es rápido, no demora más de dos horas en llegar la mayor parte de la ingesta al ciego” [28]; sin embargo, “el pasaje por el ciego es más lento pudiendo permanecer en el parcialmente por 48 horas. Se conoce que la celulosa en la dieta retarda los movimientos del contenido intestinal permitiendo una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes, siendo en el ciego e intestino grueso donde se realiza la absorción de los ácidos grasos de cadenas cortas. La absorción de los otros nutrientes se realiza en el estómago e intestino delgado incluyendo los ácidos grasos de cadenas largas. El ciego de los cuyes es un órgano grande que constituye cerca del 15 % del peso total” [28].

“La flora bacteriana existente en el ciego permite un buen aprovechamiento de la fibra” [28]. “La producción de ácidos grasos volátiles, síntesis de proteína microbial y vitaminas del complejo B la realizan microorganismos, en su mayoría bacterias gram-positivas, que pueden contribuir a cubrir sus requerimientos nutricionales por la reutilización del nitrógeno través de la cecotrofia, que consiste en la ingestión de las heces de estos animales” [29,30].

“El ciego de los cuyes es menos eficiente que el rumen debido a que los microorganismos se multiplican en un punto que sobrepasa al de la acción de las enzimas proteolíticas. A pesar de que el tiempo de multiplicación de los

microorganismos del ciego es mayor que la retención del alimento, esta especie lo resuelve por mecanismos que aumentan su permanencia y en consecuencia la utilización de la digesta” [28].

1.3. Intestino delgado

“El intestino delgado es el componente más largo del tubo digestivo y está dividido en tres porciones anatómicas: Duodeno, que es la primera porción, la más corta y la más ancha del intestino delgado. Comienza a la altura del píloro del estómago y termina en el ángulo duodenoyeyunal; yeyuno, que comienza en el ángulo duodenoyeyunal y constituye los dos quintos proximales del intestino delgado. Gradualmente cambia sus características morfológicas para convertirse en el íleon; íleon, que es la continuación del yeyuno y forma los tres quintos distales del intestino delgado, termina a la altura de la válvula ileocecal, el límite entre el íleon y el ciego perteneciente al intestino grueso” [31, 32, 33].

1.3.1. Mucosa

“Las células maduras del epitelio de la mucosa se hallan tanto en las glándulas intestinales como en la superficie de las vellosidades. Estas células consisten en:

- ❖ Enterocitos, cuya función primaria es la absorción.
- ❖ Células caliciformes, que son glándulas unicelulares mucosecretantes.
- ❖ Células de Paneth, cuya función primaria es mantener la inmunidad innata de la mucosa mediante la secreción de sustancias antimicrobianas.
- ❖ Células enteroendocrinas, que producen diversas hormonas endocrinas y paracrinas” [33].

1.3.2. Submucosa

“La submucosa está formada por un tejido conjuntivo denso que en algunos sitios focalizados contiene acumulaciones de adipocitos. Una característica conspicua del duodeno es la presencia de glándulas submucosas, también conocidas como glándulas de Brunner.

Las glándulas submucosas tubulares ramificadas del duodeno poseen células secretoras con características tanto de células productoras de cimógeno como de células productoras de moco. La secreción de estas glándulas tiene un pH de 8,1 a 9,3 y contiene glicoproteínas neutras y alcalinas e iones de bicarbonato lo cual

sirve para proteger al intestino delgado proximal al neutralizar el quimo ácido que llega desde el estómago; también acerca el pH del contenido intestinal a los valores óptimos para la acción de las enzimas pancreáticas que llegan al duodeno” [31,32].

1.3.3. Muscular Externa

“La muscular externa está compuesta por una capa interna de células musculares lisas de disposición circular y una capa externa de las mismas células, pero distribuidas en sentido longitudinal. Entre estas dos capas musculares están situados los componentes principales del plexo mioentérico o plexo de Auerbach. En el intestino delgado se producen dos clases de contracciones musculares. Las contracciones locales desplazan el contenido intestinal en dirección tanto proximal como distal y se denominan contracciones de segmentación. Estas contracciones son causadas principalmente por la capa de músculo circular y tienen la función de movilizar localmente el quilo, mezclarlo con los jugos digestivos y hacerlo entrar en contacto con la mucosa para que se absorba el producto de la digestión. Las contracciones peristálticas, que constituyen la segunda clase, se deben a la acción coordinada de ambas capas musculares (circular y longitudinal) y desplazan el contenido del intestino en dirección distal” [31,32].

1.3.4. Serosa

“La serosa de las partes del intestino delgado que están cubiertas por peritoneo dentro de la cavidad abdominal. Aparte de eso, no tiene características especiales” [31].

1.4. Mucosa del intestino delgado

“La monocapa epitelial que recubre el intestino delgado de los mamíferos es tanto la vía de absorción de nutrientes como una barrera activa entre el medio ambiente luminal y la circulación. En las primeras etapas de desarrollo después del nacimiento, las adaptaciones del intestino delgado para mejorar la absorción de nutrientes, está superditada al aumento de la superficie de absorción, la cual parece aumentar el riesgo de colonización en la mucosa por agentes potencialmente patógenos. Sin embargo, la carga bacteriana del intestino delgado, sigue siendo muy bajo en relación al aumento de la superficie de la mucosa intestinal, lo que se debe a que existen

muchos factores contribuyentes al bajo número de bacterias en el intestino delgado. Entre estos factores se incluyen las actividades fisiológicas normales del intestino como la motilidad, la secreción de jugos gástricos y pancreático-biliares, secreciones mucosas de las células caliciformes y las respuestas inmunes humorales y citotóxicas por parte de los linfocitos B y T a antígenos específicos. Por otra parte, se sabe que en las células epiteliales hay activación de genes que codifican la producción y liberación de los péptidos antimicrobianos que contribuyen como barrera contra la colonización microbiana” [34].

“Los tipos celulares que recubren el intestino delgado son cuatro tipos de células epiteliales diferenciadas, enterocitos, células de Paneth, células caliciformes y las células enteroendocrinas, las cuales se encuentran en las vellosidades y criptas se desarrollan alrededor del nacimiento y cumplen roles importantes en el mantenimiento de la homeostasis” [35,36,37].

“La diferenciación de estas células está relacionada a una interacción dinámica recíproca entre las células epiteliales y las mesenquimales que son necesarias para eventos morfogénicos y de diferenciación que ocurre durante la organogénesis y la migración cripta-vellosidad. En este desarrollo están involucrados estímulos alimentarios, bacterianos y hormonales, siendo las células de Paneth las que juegan un rol importante en el mantenimiento de esta homeostasis y en la activación de la respuesta innata a los microorganismos” [38].

“Las células de Paneth están localizadas en la base de las criptas de Lieberkühn y están distribuidas desde el duodeno hasta el íleon [39]. Estudios en ratones y humanos se observó que las células de Paneth migran hacia la parte inferior de la zona de células madres pluripotenciales, que está ubicada funcionalmente cerca de la base de cada una de las criptas de Lieberkühn del intestino delgado, con una vida media de aproximadamente 20 días, comparado con los 3-5 días de vida del enterocito [40,35]. Histológicamente, las células de Paneth se desarrollan en condiciones libres de gérmenes y de xenoinjertos tanto en intestino de ratones como en humanos, lo que demuestra que para el desarrollo estructural de células de Paneth no requieren de bacterias luminales ni de componentes de la dieta” [41].

“Las células madres pluripotenciales también dan origen a otras tres líneas celulares como son los enterocitos de absorción (que comprende más del 80% de la población

total), las células Caliciformes y las células enteroendocrinas que la mayoría de ellas migran hacia la parte superior de la zona de las células primordiales y pueblan la vellosidad intestinal. A veces, aparecen células con características morfológicas de células de Paneth y células caliciformes que son observadas en las vellosidades y son denominadas células intermedias, la función de las células intermedias no es clara, pero se ha demostrado que expresan defensinas” [42].

2. Salmonelosis en cuyes

2.1. Etiología

“La salmonelosis en cuyes es causada por serotipos del género *Salmonella sp.* En nuestro país el serotipo que con mayor frecuencia se aísla de órganos de cuyes muertos debido a esta enfermedad, es la *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, en porcentajes que superan al 95 % con relación a otros serotipos, tal como fue reportado por Chero A, et al 2017” [43], donde concluyó que la presencia de *Salmonella typhimurium* es el serovar predominante en cuyes reproductoras. “Otros serotipos aislados causante de esta enfermedad son: *S. enteritidis*, *S. florida*, *S. bredeney*, *S. pomona*, *S. dublín*, *S. ochiogu*, *S. limite*” [44, 8, 45,46].

2.2. Clasificación y nomenclatura

“El género *Salmonella sp.* se incluye en la familia Enterobacteriaceae, orden Enterobacteriales. Actualmente este género se divide en sólo dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, tomando en cuenta sus características bioquímicas generales, *Salmonella enterica* se divide a su vez en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtebae* e *indica*” [47,48].

“Según el esquema clásico de Kauffman-White basado en antígenos somáticos (O), Flagelares (H) y ocasionalmente capsulares (Vi), las salmonelas se clasifican en más de 2500 serotipos. La fórmula antigénica de una cepa se determina mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo y a partir de dicha fórmula se la clasifica en serovar o serotipo” [47,48].

“La nomenclatura recomendada consiste en denominar una cepa con fórmula antigénica, de la siguiente forma: *Salmonella enterica* subes. *enterica* serovar *enteritidis*. Sin embargo, dado que la controversia aún no ha sido resuelta, es aceptable desde el punto de vista científico emplear una nomenclatura simplificada, por ejemplo, *Salmonella enteritidis*; así esta denominación es utilizada

en muchas publicaciones y en informes clínicos de los Laboratorios de Microbiología Médica. A fin de enfatizar que los serotipos no corresponden a especies o subespecies distintas no se les escribe con letra itálica o cursiva y sus nombres comienzan con mayúscula” [47,49].

2.3. Descripción del agente causal

Figueroa y Verdugo dijeron que “Las *Salmonellas* son bacilos Gram negativos, no esporulados, con cápsula sólo en el caso de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi C* y *Salmonella dublín*, son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos a excepción de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*” [50]. “Sin embargo, estudios recientes muestran que *S. enterica* serovar Pullorum tiene motilidad en agar semisólido o en agar Hektöen e incluso en estudios de microscopia electrónica se ha podido observar un pequeño flagelo deformado. El tamaño de las salmonelas oscila entre 0.3 a 1 μm x 1.0 a 6.0 μm ” [48].

2.4. Características bioquímicas

“Las salmonelas son bacterias anaerobias facultativas, crecen rápidamente en medios simples, poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo, producen ácido y a menudo gas durante la fermentación de la glucosa u otro hidrato de carbono, además casi nunca fermentan lactosa o sacarosa. Entre otras características bioquímicas se encuentran que: reducen los nitratos a nitritos, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen ácido sulfhídrico (H_2S), son ureasa y fenilalanina desaminasa negativas. Las salmonelas son resistentes a ciertas sustancias químicas (por ejemplo, verde brillante, tetratiónato de sodio, desoxicolato sódico) que inhiben otras bacterias entéricas; por tanto, es útil incluir estos compuestos en los medios de cultivo para aislar *Salmonella sp*” [51].

2.5. Estructura antigénica

“La estructura antigénica de *Salmonella spp.* es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes; antígenos O (somáticos) y antígenos H (flagelares). En algunas cepas se encuentran un tercer tipo como antígeno de superficie, siendo análogo funcionalmente a los antígenos K de otros géneros; ya que anteriormente se pensó que se relacionaba con la virulencia, este antígeno se denominó antígeno Vi “[52].

“Los antígenos somáticos (O) son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida, estos antígenos se clasifican en mayores y menores; los primeros son los que definen a un grupo, mientras que los segundos tienen menor valor discriminativo. Los antígenos flagelares (H) son termolábiles y están constituidos por una proteína, la flagelina, algunos serovares sólo producen un único tipo de antígeno H, siendo en consecuencia, monofásicos. Sin embargo, otros serotipos pueden producir alternativamente dos tipos de antígenos H, por lo que se denominan bifásicos” [52,50].

“Los antígenos capsulares (K) sólo los posee *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella dublín*. La presencia de este Antígeno hace imposible la aglutinación de sueros anti O. La expresión de este factor depende de al menos dos genes (Vi A + Vi B); deben existir ambos en la bacteria para que dicha expresión tenga lugar” [52,50].

2.6. Epidemiología

2.6.1. Transmisión

“Las Salmonellas se propagan por contacto directo e indirecto. Los animales infectados, fuentes de las bacterias, excretan el microbio en cantidades considerables en heces y orina, contaminando así el ambiente que los rodea, principalmente el alimento. Los animales susceptibles se infectan por vía oral al consumir agua o alimento contaminado con material fecal, también se ha observado que la vía aerógena, conjuntival. Los animales susceptibles se infectan por vía oral al consumir agua o alimento contaminado con material fecal y heridas abiertas constituyen puertas de ingreso para la bacteria” [53].

Flores indicó que “El equipo e implementos de trabajo empleados en las granjas también juegan un papel importante en la diseminación de la infección. La

transmisión vertical se observa en aves, ocurriendo infecciones transováricas especialmente con *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* y *S. Thompson*” [54].

2.6.2. Factores de riesgo de la infección

Stellmacher dijo que “La forma más común de introducir la infección en una explotación es a través del alimento, dándose en este caso casi siempre una contaminación durante o tras el proceso de obtención y preparación de estos, aunque la mayoría de piensos pueden encontrarse contaminados, sólo deben considerarse sospechosos determinados piensos o determinados componentes de ellos, entre estos están la hierba fresca y el heno, principalmente aquellas que provienen de zonas regadas con aguas residuales no tratadas” [51].

“Los concentrados proteicos de origen animal o vegetal figuran también como sospechosos, muchos de los cuales; como la harina de pescado, carne y huevo pueden contener numerosos serotipos de Salmonellas, también la leche entera y la leche en polvo no correctamente preparadas pueden producir infecciones, sobre todo en animales jóvenes” [54,51]. “También son importantes de mencionar las aguas de bebida, especialmente aquellos cursos de agua contaminados con aguas residuales y las aguas estancadas que permanecen así la mayor parte del tiempo” [51,53].

“La introducción de animales portadores en explotaciones pecuarias libres de salmonelosis, es un mecanismo comúnmente involucrado en la diseminación de la infección, esto se puede observar en la ganadería bovina con la introducción de terneros excedentes de granjas de leche, los cuales se venden en ferias ganaderas” [53].

“Los roedores como ratas y ratones tienen un papel importante como transmisores de salmonelas, estos animales pueden llevar la bacteria en el tracto intestinal, frecuentemente sin mostrar signos de enfermedad, contaminando el ambiente y el alimento. Se ha encontrado una alta prevalencia de *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* en ratones de galpones de aves” [55,56].

“Otras formas menos frecuentes de contaminación incluyen insectos (moscas, cucarachas etc.), aves silvestres y larvas de nemátodos previamente infectados por *Salmonella spp.* Los animales de sangre fría como tortugas, ranas,

culebras y lagartos, frecuentemente son portadores y excretores de *Salmonella spp*” [53]. También se ha demostrado la transmisión de *S. typhimurium* a través del aire, encontrándose en diversos estudios que la bacteria puede sobrevivir en el aire el tiempo suficiente para representar un peligro de propagación” [54, 51,53].

“Las salmonelas son relativamente resistentes a ciertos factores medioambientales, pueden resistir a la deshidratación durante periodos muy prologados, se desarrollan en temperaturas de 8 y 45 °C, con concentraciones hídricas de hasta 0.94 y en intervalos de pH de 4 – 8. También son capaces de proliferar en medios con escasez o ausencia total de oxígeno” [53,57].

“Las bacterias en el medio ambiente pueden sobrevivir un promedio de 14 meses, en orina pura puede sobrevivir hasta 5 días, pero combinada con heces se ha demostrado que puede sobrevivir hasta 6 años. La bacteria es sensible al calor y no sobrevive a temperaturas superiores a los 70 °C. La pasteurización a 71.1 °C durante 15 segundos es suficiente para destruir las salmonelas en la leche” [53,57].

“Un grupo de factores que parece tener una gran influencia sobre la presencia de *Salmonella spp.* en las explotaciones son las características de producción y manejo de estas, Carstensen y Christensen (1998) describieron un aumento de la seroprevalencia relacionado con el tamaño de la explotación, de hecho, este hallazgo se relacionó con las malas prácticas de limpieza y desinfección realizadas en las explotaciones grandes. Otros factores como animales sometidos a largos viajes, alimentación deficiente y alojados en locales inadecuados influyen en la presencia de salmonelosis” [54,58].

“Una de las características epidemiológicas más importantes de las salmonelosis es su persistencia en los animales. Cuando un animal se infecta con *S. Dublin* puede convertirse en un caso clínico o en un portador activo, eliminando constante o intermitentemente bacterias por heces. También se puede convertir en un portador latente en el que la infección persiste en ganglios linfáticos o amígdalas, debido a la capacidad de la bacteria de sobrevivir en fagolisosomas de los macrófagos, sin eliminar salmonelas por heces” [53].

“Otra forma de infección es el portador pasivo, en el cual el animal constantemente se infecta de pastos o del suelo del establo, pero la bacteria no invade los tejidos, por lo que la enfermedad desaparece si se aparta al animal del

medio contaminado. La importancia de los portadores latentes radica en que pueden convertirse en portadores activos o incluso en casos clínicos si se encuentran sometidos a estrés. Es entonces cuando el propio ganado se convierte en el reservorio de la infección durante largos periodos. Un problema importante a la hora de controlar la infección por *S. dublín* es que los portadores latentes de la enfermedad no se identifican fácilmente mediante cultivo de heces o mediante pruebas serológicas” [53].

2.6.3. Factores de riesgo que predisponen a la enfermedad sintomática

“La infección por *Salmonella spp.* no es una causa suficiente para contraer una salmonelosis clínica, a excepción de los animales recién nacidos, es por ello que debemos considerar distintos factores, del hospedero, del agente o del entorno, los cuales desencadenan la enfermedad en animales infectados” [51, 49,53].

“Se acepta que para que la salmonelosis curse como enfermedad, a diferencia de la simple infección; por especies de salmonelas, es necesario la intervención de algún factor desencadenante que genere “estrés” en el animal, como el transporte o movimiento de los animales dentro del criadero o hacia el exterior, el mismo que se acentúa cuando esta práctica se realice en forma inadecuada” [8,53].

“La falta de alimentos y de agua es un factor de riesgo frecuente, generalmente en bóvidos como resultado del transporte en distancias largas. En ovejas la enfermedad se suele asociar con la falta de alimentos cuando se agrupan los animales para la vacunación, tratamientos antiparasitarios o en desplazamientos largos. Los cambios bruscos en la dieta, los cuales modifican los componentes del tubo gastrointestinal, como por ejemplo un elevado contenido en ácidos grasos volátiles y un pH bajo, como el que existen cuando un rumiante ha comido abundantemente, es desfavorable para el paso de las salmonelas a través del proventrículo” [53].

“El encierro de muchos animales jóvenes en áreas limitadas conduce a grados elevados de contaminación ambiental y una difusión rápida de la infección, también en animales adultos los brotes son más comunes cuando están estrechamente confinados. Otros factores estresantes son: la preñez, el parto, los periodos de lactación, las vacunaciones con vacunas vivas que producen

reacciones sistémicas, los tratamientos con compuestos irritantes como el tetracloruro de carbono” [59,53].

“Las enfermedades intercurrentes generan un aumento de la susceptibilidad a la salmonelosis. La asociación mejor conocida es la que existe entre el virus del cólera porcino y la *Salmonella choleraesuis*, en bóvidos la infección simultánea por *Fasciola hepática* puede actuar como factor predisponente en bóvidos, aunque no parece influir en la incidencia de la enfermedad” [59,53].

“La edad es claramente una susceptibilidad a la enfermedad clínica y también algo a la infección. Es menos probable que los animales adultos sufran de infecciones generalizadas o septicémicas como lo hacen los jóvenes. Cuando los animales adultos se infectan es muy probable que ellos se liberen de la enfermedad o que se vuelvan portadores asintomáticos por periodos indefinidos. La mayor susceptibilidad de los animales jóvenes se explica solo parcialmente por su incapacidad de obtener anticuerpos específicos del calostro; no hay ninguna explicación razonable de porqué los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos” [59].

2.7. Patogenia

“Durante el proceso infeccioso de *Salmonella sp.* se presenta una interacción hospedero-microorganismo, el cual desencadena la enfermedad sintomática si se presentan las condiciones adecuadas. El primer requisito para que se produzca la infección del hospedero por parte de la bacteria es que se encuentre en las cantidades suficientes; generalmente se requiere una dosis infectiva mínima de 10⁷ a 10⁹ bacterias” [59].

“Luego de la ingestión oral, la bacteria experimenta severos cambios medio ambientales como son: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad. *Salmonella sp.* responde a estos cambios modulando la expresión de sus genes, para luego colonizar el intestino delgado principalmente a nivel del íleon distal y ciego” [59, 53, 60, 48].

“Después que la bacteria entra al hospedero y antes de invadir cualquier tipo de célula, la bacteria debe encontrar y adherirse a uno o más tipos de células del tejido intestinal o bien a la matriz extracelular, en caso de tejido dañado, para esto la bacteria cuenta con estructuras llamadas adhesinas, las cuales permiten reconocer

moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, estos receptores determinan la especificidad del tejido así como la colonización y persistencia bacteriana. De esta manera, esta unión adhesina-receptor determina los hospederos y el organotropismo de la bacteria” [48].

“Algunos mecanismos de adhesión pueden involucrar varios tipos de fimbrias o Pili, cuatro de las cuales están genéticamente definidos. Estos incluyen a Fimbria tipo 1 (fim), fimbria codificada por plásmidos (pef), fimbria polar larga (lpf) y fimbria agregativa delgada (agf/csg), algunos estudios sugieren que estas fimbrias tienen un tropismo específico por ciertos tipos celulares o por células de especies animales particulares. Las adhesinas también tienen la capacidad de activar a linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citosinas” [61, 60, 48].

“*Salmonella sp.* inicia la invasión en el hospedero a través de enterocitos y células M, células epiteliales especializadas que recubren los nódulos linfáticos de las placas de Peyer del íleon. Las células M constituyen una puerta de entrada ideal para las enterobacterias debido a la ausencia del borde en cepillo, así como de glucocálix. La *Salmonella sp.* es capaz de entrar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas, esta técnica de invasión presumiblemente asegura un nicho celular protegido para que el microbio se replique o persista” [61, 62, 48, 63]. Sánchez y Cardona indicaron que “La *Salmonella spp.* es hábil en explotar las funciones celulares preexistentes del hospedero y usar estas funciones para su propio beneficio, característica de patogenicidad esencial de la bacteria. La *Salmonella spp.* engaña a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera” [60]. “Las células del hospedero son invadidas por un mecanismo conocido como disparo (trigger). La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento (ruffling) en su superficie, como respuesta al contacto” [61, 48].

“La *Salmonella sp.* responde a la presencia de la célula hospedera con la activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado tipo III (SSTIII) o dependiente de contacto. Este sistema permite secretar e inyectar directamente proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica, las proteínas inyectadas frecuentemente reensamblan factores eucarióticos con

funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera.

La redirección de señales de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para la colonización bacteriana y facilitando una estrategia patogénica altamente adaptada de líneas de comunicación con la defensa del hospedero” [60, 62, 48].

“El sistema de secreción tipo III dirige la exportación de varias proteínas como atpasas, proteínas regulatorias y estructurales, formadoras de canales, lipoproteínas, moléculas efectoras para células hospederas, chaperonas etc. Algunas de estas proteínas transitoriamente ensamblan una estructura apendicular llamada invasoma, mientras otras son translocadas en la célula hospedera donde ellas activan o interfieren con las vías de transducción de señales célula-hospedero conduciendo a una variedad de respuestas” [64, 60, 62].

Sánchez y Cardona dijeron que “La respuesta a la bacteria es dependiente del tipo de célula infectada. En células no fagocíticas, la *Salmonella spp.* induce cambios en la membrana plasmática de la célula hospedera, y profundos rearrreglos del citoesqueleto que se parecen estructuralmente al ruffling de membrana inducido por varios agonistas, como hormonas, factores de crecimiento, activación de oncogenes celulares, etc. El ruffling de membrana es acompañado por micropinocitosis que en últimas conduce a la internalización bacteriana. En macrófagos, la *Salmonella spp.* induce efectos citotóxicos caracterizados inicialmente por una rápida inhibición de ruffling de membrana y micropinocitosis, seguido por la muerte celular apoptótica” [60].

“Se reconocen varias proteínas efectoras involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: SipA, SopE, SopE2 y SopB. La proteína SipA se une a la actina e inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina. SopE se comporta como GEF (guanine exchange factor) en las proteínas RhoGTPasas: CDC42 y Rac induciendo ruffling de la membrana, que permite la internación de *Salmonella spp.* La proteína SopE2 activa a CDC42, la cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar el complejo Arp2/3, compuesto de 7 subunidades, incluyendo 2 proteínas relacionadas con actina y la proteína p41-Arc. Este complejo inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina.

SopB tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, también reorganiza el citoesqueleto de actina” [48].

Sánchez y Cardona afirmaron que “Existen diferentes propuestas sobre las vías de señalización inducidas por proteínas inyectadas por *Salmonella spp.* que provocan rearreglos del citoesqueleto de la célula eucariótica e internalización de la bacteria. Una vía es la propuesta por Brett Finlay y colaboradores quienes proponen que la *Salmonella spp.* inyecta en la célula eucariótica las proteínas SopE, SptP transportados por el sistema de secreción tipo II” [60].

“La sopE activa las proteínas CDC42, que están en forma inactiva en el citoplasma de la célula eucariótica ligando GDP, al activarse esta proteína CDC42 liga GTP, aumentando la fosfolipasa G y por medio de los segundos intermediarios inositol trifosfato y diacilglicerol aumenta la concentración de calcio permitiendo el rearreglo del citoesqueleto. La proteína SptP estaría implicada en la fosforilación de los residuos de tirosina de receptores ubicados a nivel de la membrana de la célula eucariótica, produciéndose así también la disrupción del citoesqueleto y el ruffling de membrana” [60].

“La actuación del SSTIII y las proteínas efectoras conduce a la liberación por parte de las células epiteliales, de citoquinas CXC, como la interleucina 8 (IL8), que ejercen una acción quimiotáctica sobre polimorfonucleares neutrófilos (PMN), importantes agentes defensivos de la respuesta inmune inespecífica del hospedador. Una vez invadido el epitelio intestinal, las bacterias se translocan rápidamente, alcanzando la lámina propia. Aquí su reconocimiento por receptores localizados tanto en la superficie de macrófagos como en la cara interna de las células intestinales, origina la producción de más citoquinas CXC, por ambos tipos de células” [65].

“Esto provoca la afluencia masiva PMN, señal de identidad de la diarrea inflamatoria causada por los serotipos no específicos de huésped. Los neutrófilos fagocitan a las bacterias, destruyéndola eficazmente [66,65]. Cabe mencionar que la producción de diarrea por parte de *Salmonella spp.* es un fenómeno complejo que involucran diversos factores de virulencia; demostrándose, además de la inflamación, la participación de una enterotoxina similar a las enterotoxinas de *Vibrio cholerae* y toxina termolabil de *E. coli*” [67,48].

“*Salmonella enterica*, por el contrario, posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, gracias a la actuación de un segundo SSTIII, codificado por la isla de patogenicidad SPI2, y de otros factores de virulencia. Sin embargo, los macrófagos que han reconocido y fagocitado a las bacterias también liberan IL12, responsable del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleucina actúa sobre los linfocitos T de tipo Th1, que a su vez liberan sustancias, como el interferón γ , que activa a macrófagos, adquiriendo estos la capacidad de destruir a las bacterias que han sobrevivido en su interior” [65].

“Las infecciones intestinales por *Salmonella spp.* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales, esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias ingeridas. La *Salmonella enterica* se dispersa por el organismo, probablemente transportadas por fagocitos, inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea originando así una bacteriemia que puede ser subclínica o sintomática, con riesgo elevado de evolucionar a septicemia” [59,68].

“La septicemia puede transcurrir como infección no localizada, que se manifiesta con fiebre, cuyos síntomas pueden persistir varias semanas e incluso degenerar en shock séptico, debido a la actuación de la endotoxina a nivel del sistema circulatorio. Además, al diseminarse por el organismo, *Salmonella enterica* puede llegar a colonizar diversos órganos, provocando infecciones locales” [59,68].

2.8. Factores de virulencia

Hensel indico que “Podemos distinguir dos grupos de factores de virulencia. Por un lado, estructuras superficiales de la bacteria que son, además, dianas del sistema inmune del hospedador. Se incluyen aquí el LPS, con actividad tóxica, debido fundamentalmente al lípido A; los flagelos, que dirigen la bacteria hacia el epitelio intestinal; la cápsula, relacionada con la invasibilidad del serotipo *typhi*; y las fimbrias” [69].

Estos genes pueden estar sueltos, formando pequeñas agrupaciones (islotes) y/o en agrupaciones mayores, llamadas islas de patogenicidad (SPI)” [69].

“Las islas de patogenicidad de *Salmonella spp.* se definen como largas agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano, que codifican para determinantes responsables de establecer las interacciones específicas con el hospedador y que son necesarias para la expresión de virulencia bacteriana en un modelo animal. Al igual

que otras islas las SPI generalmente presentan un contenido de GC menor que el resto del cromosoma bacteriano y están, frecuentemente, insertadas dentro de genes que codifican ARNt.” [69]. “*Salmonella spp* cuenta con cinco islas de patogenicidad, varios genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAP cinasas se encuentra en el centisoma 63 formando la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), los genes localizados en las SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales. La SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo 1 y se cree que participan en la adaptación en ambientes intracelulares. Finalmente, la SPI-5 codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal” [64, 62,48].

3. Células de Paneth

“Las células de Paneth presentan histológicamente un citoplasma basófilo y una zona apical altamente eosinófila dada por la presencia de gránulos de secreción que vierten su contenido al lumen de la cripta “[70]. “El contenido de los gránulos de las células de Paneth posee acción antimicrobiana y tiene un papel en la inmunidad innata local, tales como protección de las células madre de las criptas, control de la composición de la flora endógena, participación en el desarrollo y formación de la cripta y también en los procesos de fagocitosis, digestión y detoxificación “[39,12,13].” Los gránulos secretorios de las células de Paneth contienen lisozimas, α -defensinas y fosfolipasa A2 secretora” [14,15].

Oullette y Selsted dijeron que “Los análisis en profundidad sobre las células de Paneth han sido proporcionados por sus productos genéticos. Por ejemplo, la secreción de la lisozima y homólogos de péptidos antimicrobianos fagocíticos indican que las células de Paneth cumplen una función trascendental en la defensa entérica del huésped. Es así que se ha establecido mediante ensayos in vitro la función antimicrobiana de las lisozimas de las células de Paneth como son la fosfolipasa A2 de secreción (sPLA2) y α -defensinas. En los ratones, estos productos génicos que aparecen durante la ontogenia de la cripta después del parto, coinciden con la diferenciación de las células de Paneth y son marcadores útiles de la estirpe celular entérica. La secreción de este conjunto de péptidos antimicrobianos de las células de Paneth, en particular las defensinas, están involucradas en la función inmune innata” [71].

“Cada cripta contiene de 3 a 5 células de Paneth maduras que tienen un tiempo de vida entre 18-23 días, antes de ser sometidos a la degeneración y/o a la fagocitosis por sus vecinos” [35]. “La edad de las células de Paneth se correlaciona con la posición en la cripta, la mayoría de las células maduras se encuentran en o cerca de la base de la cripta” [72]. “El tamaño de los gránulos apical de la célula secretora de Paneth también se correlaciona con la edad, los gránulos más grandes son producidos por las células viejas” [35,72].

3.1. Diferenciación de células madres a células de Paneth

El epitelio intestinal es de constante y rápida renovación durante toda la vida de los vertebrados; este epitelio se puede dividir en dos compartimentos funcionalmente distintos, la vellosidad intestinal y la cripta de Lieberkühn que constituye el compartimento proliferativo del intestino delgado y que contiene células madre o progenitoras que se diferenciarán en diferentes tipos celulares siendo una de ellas las células de Paneth. Las células madres multipotentes, situadas en la parte inferior de las criptas generan nuevas células que migran hacia la zona apical de la vellosidad diferenciándose en los enterocitos, y en la base de la vellosidad en células enteroendocrinas; mientras que las células de Paneth migran a la base de la cripta y se instalan como células postmitóticas diferenciadas. El equilibrio entre la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular debe estar bien regulado para mantener la homeostasis de este epitelio. La expresión de la proteína Sox9, un factor de transcripción de la caja-HMG, se da en las células progenitoras que se encuentran en el tercio inferior de las criptas de Lieberkühn y en las células de Paneth a lo largo del intestino, así como en células tumorales del epitelio” [73]. “Sox9 fue identificado por primera vez como regulador clave del desarrollo del cartílago y de las gónadas masculinas. Sox9 también está implicado en el desarrollo de los nervios craneales derivados de la cresta neural” [74], en las células madre neurales permite pasar de la neurogénesis a gliogénesis [75] y el desarrollo en el corazón [76], el pelo [77], y páncreas [78]. En cada uno de estos tejidos, la expresión de Sox9 se limita a tipos celulares específicos, lo que sugiere una regulación transcripcional compleja. En el epitelio intestinal, la función de Sox9 sigue siendo incierto, aunque en los estudios in vitro sugieren un papel en el control de la diferenciación celular [79]. In vitro y datos in vivo indican que Sox9 es un objetivo de la transcripción de la vía de señalización Wnt, esta vía juega un papel central en las señales extracelulares para

mantener la homeostasis del epitelio intestinal. La delección condicionada de Sox9 en el epitelio intestinal da como resultado una completa ausencia de las células de Paneth, de lo que se infiere que estas proteínas son específicas y necesarias para la diferenciación de las células de Paneth [80,81].

La posición de las células de Paneth en la base de la cripta depende de la expresión del EphB3, que es un receptor de membrana que está altamente expresado en las células de Paneth ligado a la tirosina kinasa, el cual es secretado por células posicionadas próximas al lumen. La expresión de los genes EphB3 es regulada por señales β -catetina nuclear, que es constitutivamente activa en células de Paneth [82].

3.2. Secreción de las células de Paneth

3.2.1. Lisozimas

Las lisozimas son proteínas antibacteriales que se encuentran en concentraciones significativas en muchas secreciones humanas incluyendo las lágrimas, secreciones gástricas e intestinales, siendo importante en las células de Paneth en el intestino delgado [83], las lisozimas son predominantemente activas frente a bacterias Gram positivas ya que, rompen uniones glucosídicas que son las encargadas de estabilizar los peptidoglicanos, ocasionando la lisis bacterial. Las bacterias Gram negativas tienen una membrana exterior que protege los peptidoglicanos de la pared celular y son relativamente resistentes a la lisozima. La lisozima es muy importante en la respuesta innata intestinal ya que en infantes recién nacidos con colitis necrotizante se ha observado la falta de lisozima por ausencia de células de Paneth [84].

3.2.2. Fosfolipasa A2 secretoria

La fosfolipasa A2 secretora (PLA2s) es un componente de los gránulos de las células de Paneth y es liberado dentro del lumen intestinal por estimulación de productos bacterianos, incluyendo los lipopolisacáridos. Las PLA2s tiene actividad bactericida contra *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, indicando su rol en la defensa de la mucosa del intestino delgado [85].

3.2.3. Péptidos antimicrobianos: α -defensinas

La mayoría de los péptidos antimicrobianos expresados por las células epiteliales de los mamíferos son miembros de la familia de péptidos que median la muerte

de las células microbianas que no fueron oxidadas por los fagocitos [86]. En los leucocitos polimorfonucleares, que median la muerte de los microorganismos, sus péptidos antimicrobianos se almacenan en los gránulos azurofílicos y son liberados tras la fusión fagolisosomal. Mientras que los péptidos epiteliales, parecen activarse y actuar en el compartimiento extracelular, en la interfase con el ambiente externo. En el colon, las vías respiratorias, y reproductiva las células epiteliales parecen liberar péptidos antimicrobianos continua o constitutivamente. En el intestino delgado, los péptidos microbicidas se acumulan en gránulos de secreción de las células de Paneth y se liberan en la membrana apical por exocitosis regulada. Entonces podemos decir que los péptidos antimicrobianos epiteliales son homólogos a los péptidos en los gránulos azurofílicos de neutrófilos, no solo por su almacenamiento sino también por su acción antimicrobiana [87].

Las α -defensinas de origen murino fueron las primeras descritas en las células de Paneth [88] y se han expresado seis a más α -defensinas entéricas (también denominadas criptidinas) que poseen poderosas propiedades antibacteriales con una gran importancia en la defensa de la mucosa intestinal [89]. Los ratones tienen varios tipos de criptidinas y secuencias relacionadas a criptidinas (CRS) que son péptidos expresados en las células de Paneth [90,71]. La mayoría de las criptidinas de ratón pertenecen a las criptidinas del Grupo 1, siendo las excepciones las criptidinas 4 y 5 [71]. La regulación celular específica de las α -defensinas de las células de Paneth ha sido desentrañada con la reciente identificación de los factores de transcripción TCF-4, los cuales son proteínas claves en el proceso de identificación [91,92]. De los antimicrobiales las defensinas son las más abundantes en roedores y humanos. En humanos las células de Paneth expresan dos α -defensinas: HD-5 y HD-6 [93].

La familia de péptidos de CRS en ratones fue descrita inicialmente a nivel del mRNA en función de su similitud con la secuencia de pro-criptidinas [94, 95,90], pero las acciones del péptido procesado no se asemejan a las acciones de las criptidinas. Los péptidos CRS se dividen en dos grupos; CRS1C contiene 11 cisteínas y CRS4C con 9 cisteínas [94,15]. Se ha demostrado anteriormente que los péptidos CRS4C tienen actividad antimicrobiana frente a los Gram-positivos y Gram-negativos. Los espectros de actividad de estos péptidos antimicrobianos

aumentan por el hecho de que forman tanto homoy heterodímeros, que solapan las actividades de los antimicrobianos [15].

A diferencia con la típica inducción transcripcional de las β -defensinas en otras superficies mucosas los mecanismos que regulan la expresión de las α -defensinas de las células de Paneth son el procesamiento proteolítico y secreción de gránulos [89]. Un paso importante en la expresión de las α -defensinas en las células de Paneth es el procesamiento proteolítico; interesantemente, los mecanismos de procesamiento son bastante diferentes en ratones y humanos. En ratones la matrilisina MMP-7 (matriz metaloproteínasa-7) es expresada en altos niveles en las células de Paneth, cuya actividad es esencial para la producción de péptidos de criptidina activos ya que rompe el propéptido de modo que la degranulación de las células de Paneth libera la defensina activa dentro del lumen de la cripta [96]. Caso contrario, en las células de Paneth de humanos no expresan MMP-7 y las prodefensinas humanas son procesadas por la tripsina proteasa serina. La isoforma de tripsina relacionada al procesamiento de HDs hacia péptidos maduros es expresada en estas células como zimógenos inactivos [97], el procesamiento probablemente ocurre durante o antes de la secreción dentro del lumen intestinal, pero los detalles de la activación y regulación de la tripsina aún no está definida.

La secreción de los gránulos de péptidos antimicrobianos por parte de las células de Paneth son regulados por estímulos colinérgicos que pueden derivar de neuronas entéricas y autonómicas, y por productos microbiales incluyendo lipopolisacáridos, péptidoglicanos y productos de su destrucción [89], siendo esta liberación importante para el mantenimiento del equilibrio de la flora bacteriana normal en el intestino. También son importantes en la activación de linfocitos T en la lámina propia quienes secretan interleucinas que también inducen la proliferación de las células de Paneth, siendo este mecanismo no del todo conocido [98,42].

La producción de proteínas y péptidos antimicrobianos se encuentran amplia y filogenéticamente distribuidos; originalmente esta producción de antimicrobianos se describió como respuesta de los hemocitos circulantes ante lesiones en la cutícula de las larvas de insectos; actualmente son reconocidos como efectores de una barrera contra agentes patógenos bioquímicamente potenciales en plantas, insectos, anfibios, peces teleósteos y mamíferos [99]. La presión selectiva para la

síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos en la respuesta a la infección, o la amenaza constante a infecciones, parece haber sido generalizada, ya que los péptidos con potente actividad antimicrobiana in vitro se han aislado de todos los filos analizados, incluyendo plantas e invertebrados. Estos péptidos antimicrobianos preformados son muy variables en la estructura primaria, y pueden ser inducibles, sintetizándose y acumulándose continuamente en los gránulos citoplasmáticos de secreción y liberándose ya sea por regulación o de forma constitutiva [100].

La expresión de péptidos antimicrobianos gastrointestinales es evolutivamente conservada. En el tracto gastrointestinal de la rana, por ejemplo, las magaininas son péptidos antimicrobianos primarios encontrados en la piel de la rana, se encuentran también en las glándulas del estómago y también están presentes en las glándulas en la base de los pliegues del epitelio intestinal en la rana [101]. En insectos como el *Stomoxys calcitrans* la producción de defensinas del intestino se activan tras el consumo de sangre [102,103] y se observó además que el intestino medio de larvas de *Manduca sexta* contiene péptidos antimicrobianos en gránulos. Estos hallazgos sugieren que la producción y secreción de péptidos antimicrobianos a través de epitelio intestinal de los mamíferos es un mecanismo de la inmunidad innata conservadas en lugar de un desarrollo evolutivo reciente [103].

3.3. Inmunidad innata intestinal

La inmunidad innata proporciona una inmediata y continua protección de microbios, llamándose la primera línea de defensa de hospederos de la superficie de mucosa, incluyendo el intestino delgado. La inmunidad innata incluye receptores de reconocimiento de microbios, moléculas señaladoras que coordinan con varias respuestas defensivas, incluyendo la comunicación con el sistema de inmunidad adquirida, y moléculas efectoras para la incapacitación y eliminación de microbios. La inmunidad innata abarca un complejo conjunto de mecanismos de defensa mediados por células efectoras circulantes y locales [104].

Los mecanismos de inmunidad innata que protegen la mucosa intestinal comprenden los componentes mecánico, químico y celular trabajando en tres niveles: el extraepitelial, epitelial y subepitelial. El componente mecánico es la barrera física del

epitelio que incluye la capa de moco, descamación de los enterocitos y peristalsis. El componente químico incluye las moléculas de reconocimiento de patógenos, proteínas, o péptidos que induce destrucción microbial y citocinas que organiza la respuesta inmune. Los componentes físicos y químicos de la inmunidad innata proporcionan protección inmediata frente a la amenaza por la eliminación de microorganismos de colonización e infección [104]. El elemento celular incluye células epiteliales, mastocitos, células dendríticas, células fagocíticas como macrófagos y granulocitos, células natural killer y células T [105].

La barrera de defensa extraepitelial incluye proteínas y péptidos antimicrobiales, como las lisozimas y defensinas que rompen las paredes de las células microbiales, la capa de moco que atrapan las bacterias que son removidos por peristalsis y la flora comensal que proporciona resistencia a la colonización. La defensa a nivel epitelial incluye la barrera mecánica para la penetración de la monocapa epitelial y las uniones estrechas (tight junction) y los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que reconocen secciones altamente conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que están presentes en un gran grupo de microorganismos, pero no en sus hospederos y son esenciales para la patogenicidad o supervivencia del microorganismo. El componente subepitelial, incluye macrófagos, células dendríticas y miofibroblastos, reconocimiento de patógenos y sus componentes que tienen comunicación con la capa epitelial [105].

3.4. Rol de las células de Paneth en la defensa del organismo

La importancia de los péptidos antimicrobianos del intestino delgado, se han destacado tanto en ratones y humanos. Estudios en la enfermedad de Crohn demostraron que, la reducción de las α -defensinas de las células de Paneth fue implicado como un contribuyente clave para la disfunción inmune innata con cuadros de ileítis [106]. Además, se ha demostrado que ratones manipulados para presentar deficiencia de criptidinas son más sensibles a la infección oral por *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [96], mientras que los ratones transgénicos con expresiones adicionales para α -defensinas de humano (a nivel de las células de Paneth son más resistentes a Salmonelosis [107]. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las defensinas de las células de Paneth son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata en el tracto intestinal. Entonces se está demostrando que las células de Paneth a lo largo del eje longitudinal del intestino delgado son heterogéneos con

respecto a su expresión de péptidos antimicrobianos. La heterogeneidad más significativa se detectó por el péptido CRS CRS₄C, con 104 veces mayor expresión en el íleon en comparación con el duodeno. De acuerdo con estudios anteriores, la expresión de los péptidos antimicrobianos de las células de Paneth varía en respuesta a los patógenos bacterianos, lo que sugiere que este sistema de defensa es un escudo cada vez más actual de la inmunidad innata. Una evaluación de los niveles de gérmenes libres en comparación con los alojados convencionalmente en ratones reveló que la distribución relativa de algunos péptidos antimicrobianos de las células de Paneth fueron influenciados por la colonización bacteriana [108,109].

En estudios experimentales establecieron que el número de células de Paneth en el intestino delgado se incrementa como consecuencia del aumento en la carga bacteriana luminal y al examen patológico demostraron que las células de Paneth que están ordinariamente confinadas en el intestino delgado y las partes más proximales del intestino grueso, se pueden encontrar a lo largo del intestino grueso inflamado [110,111].

Estudios histoquímicos y morfológicos han demostrado la presencia de células de Paneth en algunas especies como en ratas [112], humanos [113], ardilla [114] y caballo [115]. En rumiantes ha sido determinada la presencia de células de Paneth en el intestino delgado de la oveja [116], así como en la alpaca [117], aunque existen reportes en cobayos, dichos estudios son escasos, especialmente en edades tempranas [118].

4. Tinciones generales

“La mayoría de los tejidos, sobre todo los de los animales, son incoloros y por ello necesitamos teñirlos para observar sus características morfológicas con el microscopio óptico. Ello se consigue con el uso los colorantes, sustancias coloreadas que son capaces de unirse de manera más o menos específica a estructuras del tejido aportándoles color. Se utilizan normalmente para teñir a las células y componentes tisulares que van a ser observados con el microscopio óptico y por ello se realizan habitualmente sobre secciones de tejido, siendo las más utilizadas las secciones obtenidas a partir de inclusiones en parafina u obtenidas en el criostato. Los colorantes son los elementos principales de las tinciones generales.

La molécula de un colorante tiene normalmente dos componentes importantes: uno que aporta el color, denominado cromógeno, y otro que posibilita la unión a elementos del tejido denominado auxocromo. El cromóforo es la organización molecular dentro del cromógeno responsable de la absorción de un espectro determinado de longitudes de onda. El auxocromo que se une al cromógeno puede influir en su coloración y muchos colorantes tienen más de un grupo auxocromico. El auxocromo puede ser un grupo ionizable, un grupo que reacciona covalentemente con iones metálicos (mordientes) o puede reaccionar covalentemente con el sustrato, en este caso el tejido. Los colorantes son normalmente hidrosolubles, aunque hay colorantes que carecen de grupos ionizables y sirven para teñir sustancias grasas, como gotas de lípidos” [119].

“Según la naturaleza química del cromóforo hay varios tipos de colorantes: nitrosos, ozoicos, derivados de la antroquinona, derivados de la acridina, derivados de iminas quinónicas, derivados de diferrilmetano y triferrilmetano, derivados del xanteno y derivados de las talocianinas.

Según la naturaleza química del radical auxocromo los colorantes se clasifican en:

4.1. Básicos

Son sales en las que la base, normalmente una amina, aporta el color, mientras que la parte ácida es incolora. Es decir, con colorantes catiónicos. Tienen afinidad por sustancias ácidas del tejido como el ADN o ciertos componentes de la matriz extracelular como los glicosaminoglicanos. La unión es por atracción eléctrica. Así, ponen de manifiesto el núcleo y el ARN, sobre todo el ARNr presente en los ribosomas por ser muy abundante, así como ciertas matrices extracelulares ricas en componentes ácidos. Ejemplos de colorantes básicos son la tionina, safranina, azul de toluidina, el azul de metileno o la hematoxilina” [119].

4.2. “Ácidos

Son sales con el anión coloreado y la base incolora. Son derivados de grupos sulfónicos, carboxilos o hidroxilos fenólicos. Tienen afinidad por sustancias básicas, sobre todo estructuras proteicas localizadas en el citoplasma celular y también por el colágeno de la matriz extracelular. La unión es por atracción eléctrica. Ejemplos de colorantes ácidos son la fucsina ácida, verde rápido, naranja G o la eosina” [119].

4.3. Colorantes mordientes

Son aquellos que se usan en combinación con sales metálicas, que actúan como mordiente. Estas sales se pueden emplear junto con el colorante, antes o después. En algunos casos el colorante mordiente puede ser también aniónico o, menos frecuentemente, catiónico. Normalmente se emplean para teñir los núcleos. Por ejemplo, la hematoxilina férrica de Heidenhain.

4.4. Neutros

Poseen una porción ácida y otra básica, ambas con capacidad para aportar color. Por tanto, un mismo colorante puede teñir tanto las partes básicas como las ácidas de los tejidos. Por ejemplo, el eosinato de azul de metileno.

4.5. Indiferentes o hidrofóbicos

Realmente no se unen a elementos de los tejidos por afinidad química sino porque se disuelven en ellos. Por ejemplo, el colorante Sudan se disuelve en los lípidos y por tanto teñir a las gotas de lípidos, especialmente en los adipocitos.

Los colorantes usados en histología se emplean a muy altas concentraciones y la cantidad que se une al tejido es realmente pequeña. Por eso, una solución de colorantes se puede usar muchas veces sin que se agote. La manera en cómo se consigue una tinción adecuada se puede dividir en dos tipos: progresiva y regresiva. La tinción progresiva consiste en obtener una coloración adecuada controlando el tiempo de la sección en el colorante, de modo que, a más tiempo, más coloración. La tinción regresiva consiste en la eliminación lenta de colorante de una tinción que ha sido teñida en exceso. Esta eliminación se consigue normalmente con soluciones alcohólicas y al proceso se le denomina desteñido. La concentración de la solución y tiempo de diferenciación nos aporta la coloración adecuada” [119].

“En algunas ocasiones necesitamos resaltar elementos tisulares de manera específica y para ello usamos colorantes que tienen apetencia por dichas estructuras. Por ejemplo, la tinción denominada Azan contiene azocarmin y naranja-anilina-ácido acético que tiñen los núcleos de rojo y sobre todo destaca el conectivo intensamente teñido de azul. Otra tinción combinada es el tricromio de Mallory que tiñe el colágeno de verde y las células musculares de rojo.

Cuando un colorante se une al tejido y aporta un color diferente al que tiene en solución se dice que ha ocurrido un fenómeno de metacromasia. Esto se debe a que las propiedades de absorción de la luz del colorante cambian al unirse a componentes celulares. Por

ejemplo, el azul de toluidina se vuelve púrpura cuando se une a ciertos gránulos de los mastocitos. Cuando el colorante unido al tejido tiene el mismo color que en solución se denomina ortocromasia” [119].

4.6. Tinción general

“Una de las tinciones más comúnmente usada en histología es la hematoxilina eosina sobre cortes de parafina. Como vemos se usa un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina) para teñir de diferente color a las estructuras ácidas y básicas de la célula. Antes de proceder a la tinción, si partimos de cortes de parafina, tenemos que llevar a cabo unos tratamientos previos sobre las secciones como es el desaparafinado y la hidratación, puesto que estos colorantes son hidrosolubles. Si partimos de cortes de criostato esto no se lleva a cabo” [119].

4.7. Tinción de semifinos

“Cuando se procesa material para microscopía electrónica es necesario a veces hacerse una idea de que zona del tejido vamos a cortar. Téngase en cuenta que el área de una sección para observar con el microscopio electrónico es muy pequeña. Además, el proceso de osmificación que ha de llevarse a cabo previamente a la inclusión acarrea el oscurecimiento del tejido, con lo que dificulta aún más la orientación de la muestra. Por ello es frecuente hacer secciones de 0,5 a 1 μm de grosor, denominadas secciones semifinas, con el ultramicrotomo para orientarnos en la muestra y seleccionar la zona a partir de la cual haremos las secciones ultrafinas. Los semifinos suelen tener áreas más grandes que las que posteriormente vamos a usar para la obtención de las secciones ultrafinas. El colorante usado para teñir secciones semifinas es normalmente el azul de toluidina, el cual puede infiltrarse en la resina calentada en una plancha y llegar hasta el tejido” [119].

4.8. “Contraste de ultrafinos

Aunque las secciones para microscopía electrónica se pueden observar directamente con el microscopio electrónico se suelen tratar previamente con metales pesados en un proceso denominado contraste, obteniendo así una imagen óptima de la ultraestructura celular. El contraste no es una tinción, puesto que no aporta color a la muestra, pero sí es un proceso habitual para poder observar los componentes ultraestructurales de la célula. Por ese motivo lo incluimos en este apartado. Téngase en cuenta que en la microscopía electrónica lo importante no es añadir sustancias

coloreadas sino moléculas que puedan interferir con el camino de los electrones emitidos por el microscopio y que chocan contra la muestra. Los metales pesados unidos al tejido impedirán que pasen los electrones y por tanto se verá una zona negra en la pantalla fosforescente, mientras que en aquellas zonas de la célula donde no estén estos metales dejarán pasar los electrones y provocarán áreas luminosas en dicha pantalla. Por ello todas las imágenes originales de microscopía electrónica son en blanco y negro, aunque se puedan colorear posteriormente con un ordenador” [119].

5. Análisis de antecedentes investigativos.

- **Cueva, S. et al. 2012 [120]** en su estudio titulado identificación de las células de Paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad.; cuyo objetivo fue identificar las células de Paneth en el intestino delgado de crías de alpacas. Se utilizaron 18 animales de descarte entre 1 y 21 días de edad. Se tomaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon, que fueron fijadas en formol al 10%. Se prepararon cortes histológicos con hematoxilina-eosina (H-E) y tricrómico de Masson. Mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal antilisozima se identificó la presencia de gránulos de lisozima. Con las coloraciones no se pudo identificar en forma precisa las células típicas de Paneth, mientras que mediante inmunohistoquímica se observó células con presencia de gránulos de lisozima en la base de las criptas de Lieberkühn de duodeno, yeyuno e íleon desde el primer día de edad; siendo mayor el número en yeyuno e íleon entre los 15 y 21 días de edad. Las células presentaron un área de 129.19 a 147.67 μm^2 , ejes mayores entre 17.96 y 19.92 μm y ejes menores entre 8.68 y 9.79 μm . Se concluye que las células encontradas corresponden a células de Paneth.
- **Bedini, O. et. al 2014 [121]** Cuya investigación se titula Colitis ulcerosa y células de Paneth metaplásicas, quienes examinaron retrospectivamente 29 casos de pacientes con diagnóstico clínico e histopatológico de colitis ulcerosa o altamente compatible con colitis ulcerosa. Las biopsias correspondieron a tomas de mucosa rectal y/o sigmoidea en pacientes humanos. Los cortes histopatológicos de archivo fueron coloreados con hematoxilina y eosina. Donde se evidenció que el 60% del total de pacientes con colitis ulcerosa estudiados presentó células de Paneth distales (en recto y/o sigmoides). Se observó una correlación directa con el mayor tiempo de evolución

de la enfermedad. En los pacientes con presencia de células de Paneth, la mediana de evolución de la enfermedad fue de 7 años y de 3 años para los pacientes sin células de Paneth.

En casos de larga evolución se presentaron entre dos y cinco criptas intestinales con células de Paneth, y el número de estas células fue mayor, habiéndose encontrado 11 células como máximo. También a mayor tiempo de evolución de la enfermedad, se identificó una distribución irregular de las células de Paneth, las cuales se alejaron del fondo de las criptas para ubicarse en zonas más altas dentro de las criptas. A mayor número de células de Paneth halladas, se observó una mayor infiltración leucocitaria de la mucosa. Llegando a las siguientes conclusiones:

Se mostró una correlación directa de la presencia de células de Paneth con el tiempo de evolución de la enfermedad y con la infiltración leucocitaria de la mucosa, concluyendo que los pacientes con más de tres años de evolución de colitis ulcerosa presentaron mayor número de células de Paneth, lo que sugiere que se activan los mecanismos de diferenciación celular a medida que el proceso inflamatorio se hace más crónico, aumentando el número de las mismas, tratando de controlar los niveles de inflamación y de infección en la luz glandular, y llevando a una homeostasis entre el epitelio y el sistema inmune.

- **Martínez, D et al 2009 [122]** en su investigación titulada: Cambios morfológicos producidos por el estrés sobre la población de células de Paneth, cuyo objetivo fue estudiar el efecto del estrés sobre la morfología y población de células de Paneth, utilizaron 18 ratas en grupos de tres: grupo control, grupo de estrés agudo y grupo de estrés crónico inducidos por el modelo de nado forzado; se sacrificaron por perfusión y, obtenidos los segmentos del intestino delgado, se procesaron por método histológico convencional y los cortes de 5 micras se colorearon con tricrómica de Gomori, lectina de trigo y con rodamina, revelando anticuerpo contra alfa defensina. Bajo el microscopio se observó el número de células de Paneth y el aspecto de sus gránulos. Registraron un aumento en el número de células de Paneth y de sus gránulos en todos los segmentos. Se atribuyó que el incremento numérico puede ser expresión de estimulación de la maduración y el de gránulos, de activación funcional, por lo que la población de células de Paneth es sensible al estrés y responde con indicadores de estimulación.

- **D A Elphick, Y R Mahida 2005 [105]** titulada “Células de Paneth: El rol en la inmunidad innata y en la enfermedad inflamatoria intestinal.”

Una variedad de mecanismos es necesaria para mediar la protección contra microorganismos en el intestino ante la inducción de respuestas inmunes adaptativas altamente específicas.

Estudios recientes sugieren que “las células de Paneth juegan un papel importante papel en la defensa innata a través de su capacidad para segregar péptidos y proteínas antimicrobianos. Hay interés actual en el huésped y factores microbianos que pueden regular la función de la célula de Paneth, como son capaces de responder a componentes de la flora microbiana comensal y la actual en la contribución de estas células a la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal.”

- **Toth 1980 [114]** en su investigación titulada “Cambios ultraestructurales en las células de Paneth durante la hibernación en la ardilla de tierra *Spermophilus lateralis*”.

La ultraestructura de las células de Paneth de los segmentos yeyuno-ileales del intestino delgado de la ardilla de tierra, *S. lateralis*, se examinó en condiciones eutérmicas normales y durante las condiciones metabólicas profundamente deprimidas de la hibernación natural. Las células de Paneth obtenidas de animales en hibernación dieron evidencia de una actividad marcadamente reducida en comparación con las células de Paneth de animales eutérmicos. En los animales en hibernación, los núcleos eran más pequeños, con nucleolos menos prominentes y con una mayor proporción de heterocromatina. En animales en hibernación, el retículo endoplásmico rugoso fue fragmentario y mal organizado, en contraste con la disposición típica de las laminillas concéntricas observadas en animales eutérmicos. Aunque el número total de ribosomas disminuyó en los animales en hibernación, hubo proporcionalmente más ribosomas libres que en los animales eutérmicos. Las células de Paneth de animales en hibernación también contenían un mayor número de gránulos secretores apicales que eran más pequeños y más variables en densidad electrónica que los gránulos de animales de control. Estas características ultraestructurales indican que, durante la hibernación, la célula de Paneth está relativamente inactiva.

- **Bry et al (1994) [40]** La investigación titulada” La diferenciación de células de Paneth en el intestino en desarrollo normal de ratones transgénicos”, refiriendo que las células de Paneth representan una de las cuatro principales células epiteliales en el intestino delgado del ratón. Es el único en la zona de células madre ubicada en la parte inferior de la base de la cripta de Lieberkuhn. Las células maduras de Paneth liberan factores de crecimiento, digestivos, enzimas, y péptidos antimicrobianos de su secretor apical. Algunos de estos factores pueden afectar el tallo de la cripta: La célula, sus descendientes de células de tránsito, la diferenciación de las células epiteliales asociadas a las vellosidades y / o la microflora intestinal. Se utilizaron métodos inmunocitoquímicos únicos y multipolares para estudiar la diferenciación de células de Paneth durante y después de la finalización de morfogénesis intestinal en ratones normales, gnotobióticos y trasgénicos. Este linaje emerge coincidentemente con citodiferenciación del endodermo interno fetal pequeño, la formación de criptas a partir de un epitelio intervillus, y el establecimiento de una jerarquía de células madre. El programa de diferenciación inicial implica la expresión secuencial de criptdinas, una fosfolipasa A2 (factor de mejora) y lisozima. Un dramático incremento en el número de células de Paneth por cripta ocurre en la etapa postnatal en los días 14-28, cuando las criptas proliferan por fisión. El establecimiento de este linaje no es dependiente. Los cuatro linajes principales de células epiteliales del intestino delgado de un ratón adulto se derivan de una célula madre multipotente ubicada cerca de la base de las criptas de Lieberklhn. Los descendientes inmediatos de la célula madre se someten a varias rondas de división celular en la porción media de la cripta. Después de salir del ciclo celular, los miembros de los linajes, enteroendocrino y enterocítico completan su diferenciación durante una migración ascendente de 2 a 5 días a la zona apical de vellosidades asociadas. Las células de Paneth se diferencian durante una migración hacia abajo a la base de la cripta, donde residen durante -20 días antes de ser eliminadas por fagocitosis. Una variedad de funciones ha sido atribuidas a las células de Paneth. Estas funciones incluyen la modulación de la microflora intestinal y el mantenimiento de las barreras de defensa de la mucosa a través de producción de péptidos antimicrobianos (criptdinas, lisozima).
- **Vásquez C, et al (2014) [123]** El objetivo de su estudio fue establecer la presencia, el número y las características morfométricas de las células de Paneth en el intestino

delgado de cobayas durante la lactancia. Utilizaron 48 cachorros de 0 a 15 días de edad. Las muestras del intestino delgado se fijaron en formaldehído tamponado al 10% (pH 7,4) y se procesaron para estudios histológicos y morfométricos con hematoxilina y eosina (HE), tinción con tartrazina o la tinción con Tricromico de Masson o inmunohistoquímica para la lisozima. Las células de Paneth se identificaron morfológicamente en el día 2 utilizando las tinciones de tricrómico de Masson, y en el día 4 utilizando HE, mientras que utilizando inmunohistoquímica se reconocieron desde el nacimiento. Se encontraron diferencias morfométricas entre las secciones intestinales en cada edad estudiada y dentro de cada sección durante las primeras semanas de vida. En todas las etapas de desarrollo, se observó el mayor número de células de Paneth en el duodeno de cobayas de 13 días. Los resultados confirmaron la presencia de células de Paneth en el intestino delgado de cobayas desde el nacimiento.

- **Shi J. (2007) [124]** En su trabajo titulado “Defensinas y células de Paneth en la enfermedad inflamatoria intestinal”. Las defensinas son péptidos antimicrobianos producidos por fagocitos profesionales, células de Paneth y células epiteliales intestinales. Además de su potente actividad antimicrobiana, las defensinas también pueden modular la función y el movimiento de los neutrófilos, monocitos, linfocitos T, células dendríticas y células epiteliales. Las células de Paneth están equipadas con múltiples defensinas y proteínas antimicrobianas y generalmente residen en el intestino delgado. Esta revisión destaca las diversas funciones de las defensinas y los cambios en la expresión de defensinas y la proliferación de células de Paneth en la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y los modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal. Los datos actuales favorecen la hipótesis de que las defensinas y las células de Paneth pueden desempeñar funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria intestinal mediante 2 mecanismos distintos: El primer mecanismo es actuar como moléculas efectoras y células contra microbios patógenos, mientras que el segundo es regular las funciones de las células inmunitarias del huésped.
- **Ralph A. (1978) [125]** En su investigación titulada “Importancia de la reacción inflamatoria intestinal en la secreción intestinal mediada por *Salmonella sp.*”: La capacidad de *Salmonella typhimurium* para invadir el epitelio intestinal es esencial

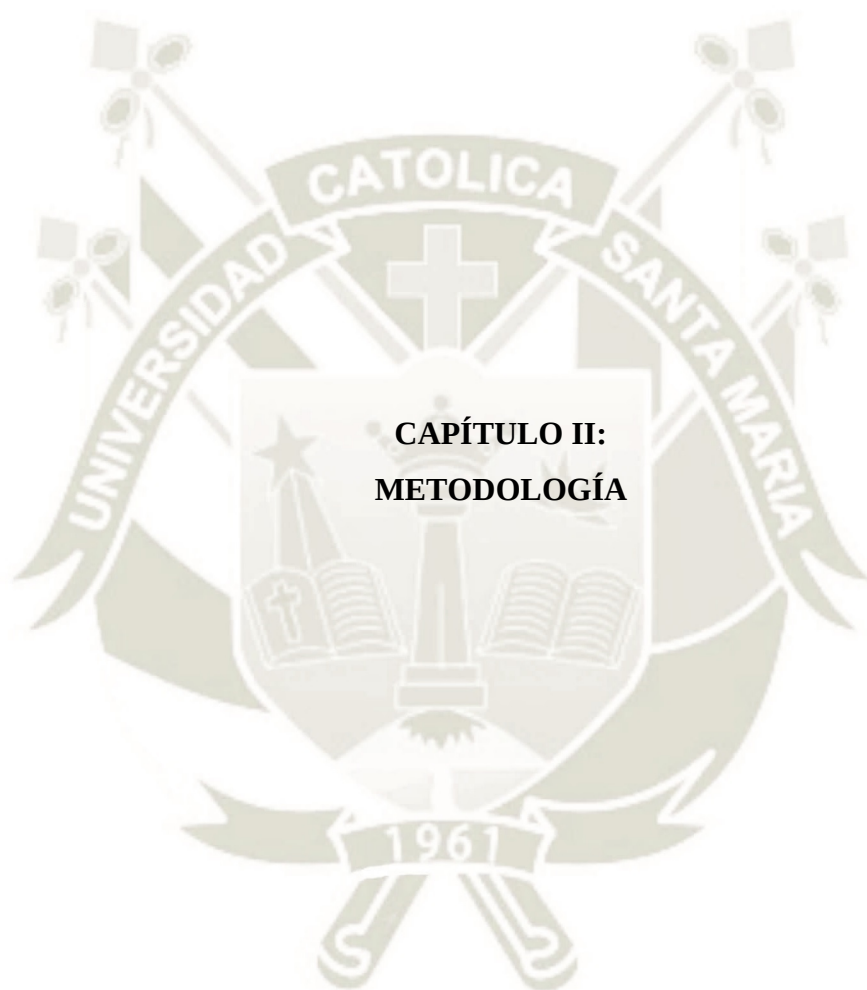
para la patogenia de la secreción intestinal inducida por *Salmonella*. Esta invasión se acompaña de una intensa reacción inflamatoria aguda. El estudio probó la hipótesis de que la reacción inflamatoria aguda puede tener un papel en la patogenia de la secreción inducida por *Salmonella*. Dos grupos de conejos infectados con *S. typhimurium* fueron estudiados: animales normales y animales pretratados con mostaza nitrogenada. La mostaza nitrogenada reduce la sustancia polimorfo nuclear del leucocito y de este modo previene la formación de una aguda reacción inflamatoria. Las ligaduras de la curva del Íleon fueron construidas e infectadas 72h después de la administración de la mostaza nitrogenada cuando el leucocito polimorfo nuclear fue indetectable. El tratamiento de la mostaza hidrogenada marcadamente inhibe la secreción de la *salmonella*. La histología del íleon en animales normales infectados con *S. typhimurium*, reveló intensa reacción aguda inflamatoria en animales pretratados con mostaza nitrogenada solamente un leucocito polimorfonuclear raro fue visto. El efecto antisecretor de la mostaza nitrogenada no inhibió la secreción de la toxina del cólera y no alteró cualquier morfología del íleon ni las actividades de varias enzimas del intestino en animales normales. La mostaza nitrogenada tampoco alteró la virulencia de la *S. typhimurium*. Estos datos sugieren que: la reacción mucosa inflamatoria inducida por la invasión de la *Salmonella* puede ser importante en la patogénesis del proceso secretorio de la *Salmonella*. El mecanismo por el cual la reacción inflamatoria estimula la secreción es no sabida.

-Cheng H, et al (1969) [126] En su investigación titulada Renovación de células de Paneth en el intestino delgado del ratón: El origen y el destino de las células de Paneth se examinaron en duodeno, yeyuno e íleon de ratones hembras adultos, utilizando radioautografía después de la administración de 3H-timidina en una sola inyección o en agua potable durante cuatro días o como una infusión continua durante hasta diez días. Los tejidos se fijaron por perfusión con paraformaldehído al 4%. Las secciones individuales o en serie de Eponembedded de un micrón de grosor se tiñeron con hematoxilina de Regaud, se radioautografiaron y se tiñeron con safranina O.

La mitosis de las células de Paneth nunca se observa, ni estas células se marcan una hora después de la 3H-timidina. Por lo tanto, las células de Paneth no se dividen. Sin

embargo, unos pocos días después de la inyección única o la administración prolongada de 3H-timidina, aparecen células de Paneth marcadas. Las primeras células marcadas tienen gránulos pequeños, pero, a medida que las células envejecen, se observan gránulos cada vez más grandes. Adyacentes a las células de Paneth se encuentran células delgadas indiferenciadas que muestran mitosis frecuentes y un marcado temprano. La evidencia apunta a que algunas de estas células se transforman en células de Paneth. Dado que ocasionalmente las células de Paneth se degeneran, las recién formadas reemplazarán a las que mueren, asegurando así el estado estable de la población de células de Paneth. La renovación de esta población se caracteriza por un tiempo de rotación de aproximadamente tres semanas.





**CAPÍTULO II:
METODOLOGÍA**

1. Lugar y tiempo de estudio

El trabajo se realizó en el Distrito de Cayma, que está ubicado en la parte central y Norte de la Provincia de Arequipa a 16°23'17" latitud sur y 71°32'57" longitud oeste [127], a una altitud de 2,368 msnm, con una temperatura promedio de 21°C y escasa precipitación.

2. Unidades de estudio

Se utilizaron 16 cuyes: 8 cuyes fueron infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurim* y 8 fueron el grupo control, comprendidos entre hembras y machos de la línea 1, criados en jaulas metálicas; la alimentación fue concentrado comercial de Marca Tomasino® y agua potable *ad libitum*.

Las muestras se encontraron en tacos de parafina y fueron tomadas de cobayos de la Línea 1, al momento de la muerte del animal (entre 28-39 días de edad), comprendidos entre cuyes sanos y enfermos.

3. Materiales:

Equipos y materiales para el procesamiento de muestras

- Guantes
- Equipo de disección
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Frascos estériles
- Material de limpieza
- Lapiceros de tinta indeleble
- Lápiz
- Cuaderno de apuntes

Sustancias, reactivos y colorantes

- Xilol
- Alcohol de 80°, 95° y 100°

- Hematoxilina
- Eosina
- Agua destilada
- Bálsamo de Canadá ®

Equipos de laboratorio

- Micrótopo
- Cubetas de coloración de plástico y vidrio
- Láminas cubreobjetos y portaobjetos
- Computadora (Intel Inside Core i5)
- Microscopio trinocular con luz incorporada Carl Zeiss (Primo Star ®, Alemania)
- Cámara digital Canon Powershot G9 de 12 megapíxeles

4. Infección de los animales

Las cepas en estudio, fueron aisladas de diferentes órganos las cuales fueron obtenidas de cuyes en infección clínica, dichas muestras fueron aisladas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

La fase inicial de estudio involucro la extracción de cepas de un estado de conservación, reactivadas en caldo de soya tripticasa, resebradas en agar nutritivo, permitiendo verificar su pureza, y poder así mantener las colonias puras en tubos con agar tripticasa de soya. Las muestras se inocularon en caldo tetrionato (Merck) y se procedió a la incubación a 42 °C por 24 horas. A continuación, se realizó el sembrado por agotamiento en medio selectivo: Agar Mac Conkey.

Posteriormente la cepa fue introducida en suero fisiológico utilizando los estándares de turbidez de McFarland.

Los 8 cuyes fueron infectados al día 24 de vida por vía oral, con una dosis de 10^9 - 10^{12} UFC contenidos en 1 ml de *Salmonella typhimurium*.

Posteriormente a la infección experimental, los animales murieron entre los días 28, 32, 33, 36, 39, de edad.

5. Toma de Muestras

Los cuyes infectados experimentalmente fueron identificados con signos de enfermedad que son: depresión, diarrea, disnea, pelo hirsuto, baja condición corporal, aborto, parálisis de miembros, aislamiento del animal, una vez muertos, por el transcurso de la enfermedad. Todos los animales infectados experimentalmente fueron trasladados a un ambiente externo para realizar la necropsia, se procedió a aperturar la cavidad abdominal y a la exposición del tracto gastrointestinal, se identificaron los intestinos delgados y fueron divididos en duodeno, yeyuno e íleon, de cada porción se tomó 1 muestra de 2 cm y se colocaron en un frasco contenido con formol al 10%. Lo mismo sucedió con los cuyes sanos, fueron eutanasiados mediante dislocación cervical y se procedió a aperturar y tomar las muestras respectivas del duodeno, yeyuno e íleon.

La toma de muestras se realizó entre los meses de Febrero y Marzo del año 2018. El manejo de los animales se realizó siguiendo los Principios Directrices Internacionales para la investigación biomédica que implica el uso de animales del consejo de organizaciones internacionales de las ciencias médicas.

Las actividades de procesamiento de muestras se realizaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina de la UNSA.

6. Estudio Histológico

Las muestras fueron procesadas mediante técnicas histológicas e incluidas en parafina.

Se realizaron cortes de 5 μ m de espesor y luego coloreadas con las tinciones de Hematoxilina – Eosina, PAS, Lendrum y puestas en laminas portaobjetos y cubreobjetos.

Las muestras fueron observadas y analizadas al Microscopio en objetivos de 10 x y 40 x. con el microscopio trinocular Carl Zeiss (Primo Star[®], Alemania), para luego capturar las imágenes con objetivos de 4x, 10x y 40x con la cámara digital Canon Powershot (A 650i[®] de 12 MP, Japón) acoplada al microscopio.

7. Tinciones Utilizadas

7.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA -EOSINA

El procedimiento de coloración de H & E es el siguiente:

- a) Desparafinar los cortes en:
 - Xilol ----- 3 minutos
 - Xilol ----- 3 minutos
- b) Hidratar los cortes en baños decrecientes de alcohol:
 - Alcohol absoluto (100°) -----3 minutos
 - Alcohol absoluto (100°) ----- 3 minutos
 - Alcohol de 95° ----- 3 minutos
 - Alcohol de 95° ----- 3 minutos
 - Alcohol de 70° ----- 3 minutos
 - Agua corriente ----- 5 minutos.
 - Agua destilada (2 baños) -----1 minuto (cada uno)
- c) Colorear con la hematoxilina alumínica de Harris -----3 a 5 minutos
- d) Lavado en agua destilada (2 baños) -----un minuto cada uno.
- e) Diferenciar, para eliminar el exceso de colorante, se emplea el alcohol ácido, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células sean los únicos que permanezcan teñidos:
 - Lavar en agua corriente----- 2 minutos
- f) Invertir al color azul
 - Lavar en agua corriente ----- 5 minutos
- g) Lavar en agua destilada (2 baños) -----1 minuto c/u.
- h) Deshidratar en baños crecientes de alcohol etílico
 - Alcohol de 70° ----- 1 minuto
 - Alcohol de 95° -----1 minuto
 - Alcohol de 95° -----1 minuto
 - Alcohol absoluto (100°) -----1 minuto
 - Alcohol absoluto (100°) -----2 minutos
- i) Aclarar empleando xilol
 - Xilol ----- 1 minuto
 - Xilol ----- 2 minutos

En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar en ellos, el montaje con bálsamo de Canadá[®] (Biopack) y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire [128].

7.2. TINCIÓN DE PAS

7.2.1. Técnica en secciones de tejidos

- Desparafinizar y luego hidratar hasta el agua destilada.
- Realizar la Oxidación con ácido peryódico durante 5 min. (10 min)
- Enjuagar con agua destilada.
- Ponemos el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 min. (30 Min)
- Lavar con agua tibia normal durante 10 min.
- Para el contraste se usa Hematoxilina de Mayer durante 15 min o a su vez la Hematoxilina de Harris durante 6 min. (1 min)
- Lavar con agua corriente durante 15 min. (8 min)
- Deshidratar y aclarar con alcohol al 95% o alcohol absoluto y xileno con dos cambios por dos minutos cada uno.
- Realizar el montaje con bálsamo de Canadá[®] [129].

7.3. TINCIÓN DE LENDRUM

La tinción de Lendrum sirve para identificar mejor las células de Paneth pues presenta una coloración rojiza- anaranjada.

La identificación de Células de Paneth, se realizó siguiendo el método de Lendrum, con las muestras ya fijadas en láminas portaobjetos.

- Deshidratar las láminas con alcohol de 70°.
- Dejar las láminas en agua destilada por 15 minutos.
- Sumergir las láminas 5 veces en agua corriente.
- Colorear las láminas coloreadas con Floxina por 30 minutos.
- Colorear las láminas con Ácido Pírico por 5 minutos.
- Deslizar las láminas por Alcoholes de 70°.
- Pasar las láminas por Alcoholes de 90°.
- Pasar las láminas por Alcohol absoluto.
- Pasar las láminas por Xylol para aclarar mejor las muestras.
- Plasmar el montaje con bálsamo de Canadá



**CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

1. Descripción morfológica de las células de Paneth

Se observo que, las células de Paneth presentan forma piramidal con el ápice apuntado hacia el lumen, se ubican en la base de la cripta de Lieberkühn en el duodeno, yeyuno e íleon, resultados que conciertan con Gent donde indica que adquieren la forma de pirámide truncada, con el núcleo colocado hacia la base; una considerable proporción del citoplasma apical está ocupada por gránulos secretorios característicos, esféricos, grandes y acidófilos, haciendo más fácil su identificación.

En la presente tesis no muestran cambio morfológico alguno, excepto en la cantidad de gránulos citoplasmáticos en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurium*. en comparación a los cuyes sanos, cuyos resultados concuerdan con Ralph a. Giannella [119] quien indica que no existen cambios morfológicos notables, también concuerdan con Hazel et al 1969 [120] quien indica que se observan gránulos grandes en las células de Paneth y del mismo modo con Toth 1980 [108] indicando que las células de Paneth no se alteran en animales eutérmicos en comparación a animales en hibernación afirmando dichos resultados.

2. Cuantificación de las células de Paneth

A continuación, se consumó la cuantificación de las células de Paneth comprendidos entre el duodeno, yeyuno e íleon de cuyes sanos y cuyes enfermos experimentalmente.

TABLA N° 1:
CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA EN DUODENO EN CUYES SANOS

CANTIDAD DE DUODENOS SANOS	8
REPETICIONES	24
N° TOTAL DE CÉLULAS DE LAS CRIPTAS	400
N° DE CÉLULAS DE PANETH	173
PROMEDIO DE CÉLULAS PANETH/CRIPTA	7,21(7)

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 3 criptas por cada duodeno, teniendo un total de 24 observaciones o repeticiones.

Se contaron el total de células de todas las criptas (400) y el total de células de Paneth en todas las criptas (173).

El promedio de Células de Paneth por cripta en el duodeno de cuyes sanos es de 7.21 (7), dicha cifra corresponde al número total de células de Paneth sobre las repeticiones.

TABLA N° 2:
CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA EN DUODENO DE CUYES ENFERMOS
EXPERIMENTALMENTE

CANTIDAD DE DUODENOS ENFERMOS	8
REPETICIONES	24
N° TOTAL DE CÉLULAS DE LAS CRIPTAS	456
N° DE CÉLULAS DE PANETH	313
PROMEDIO DE CÉLULAS PANETH/CRIPTA	13,04(13)

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 3 criptas por cada duodeno (8), teniendo un total de 24 observaciones o repeticiones.

Se contaron el total de células de todas las criptas (456) y el total de células de Paneth en todas las criptas (313).

El promedio de Células de Paneth por cripta en el duodeno de cuyes enfermos es de 13.04 (13) dicha cifra corresponde al número total de células de Paneth sobre las repeticiones.

TABLA N° 3:
INCREMENTO DE CÉLULAS DE PANETH EN DUODENO DE CUYES
SANOS Y CUYES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
Salmonella typhimurium

	SANOS	ENFERMOS	INCREMENTO
DUODENO	173	313	140

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 173 células de Paneth en cuyes sanos, mientras que en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella Typhimurium* fue de 313, es así que existe un notable incremento de 140 células de Paneth en el duodeno de cuyes sanos y enfermos experimentalmente.

Los resultados coinciden con Vásquez, et al 2014 [117], donde indican que fue mayor el número de Células de Paneth en el duodeno de cobayos en todas las etapas, estos resultados podrían deberse a que las células de Paneth aumentan en procesos infecciosos [99,108].

Bedini, et al 2014 [115] en sus resultados de biopsias correspondientes a mucosa rectal y sigmoidea de pacientes humanos deduce que, la presencia de células de Paneth es mayor cuando la unidad experimental transcurre una enfermedad.

Igualmente, Shi J. 2007 [118] informó que “la proliferación de las células de Paneth y el aumento en la expresión de defensinas en animales con inflamación intestinal” aportando a nuestra teoría.

TABLA N° 4:
CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA EN YEYUNO DE CUYES SANOS

CANTIDAD DE YEYUNOS SANOS	8
REPETICIONES	24
N° TOTAL DE CÉLULAS DE LAS CRIPTAS	508
N° DE CÉLULAS DE PANETH	277
PROMEDIO DE CÉLULAS PANETH/CRIPTA	11,54(12)

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 3 criptas por cada yeyuno, teniendo un total de 24 observaciones o repeticiones.

Se contaron el total de células de todas las criptas (508) y el total de células de Paneth en todas las criptas (277).

El promedio de Células de Paneth por cripta en el yeyuno de cuyes sanos es de 11,54 (12), dicha cifra corresponde al número total de células de Paneth sobre las repeticiones.

TABLA N° 5:
CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA EN YEYUNO DE CUYES ENFERMOS
EXPERIMENTALMENTE

CANTIDAD DE YEYUNOS ENFERMOS	8
REPETICIONES	24
N° TOTAL DE CÉLULAS DE LAS CRIPTAS	605
N° DE CÉLULAS DE PANETH	318
PROMEDIO DE CÉLULAS PANETH/CRIPTA	13,25(13)

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 3 criptas por cada yeyuno (8), teniendo un total de 24 observaciones o repeticiones.

Se contaron el total de células de todas las criptas (605) y el total de células de Paneth en todas las criptas (318).

El promedio de Células de Paneth por cripta en el yeyuno de cuyes enfermos es de 13,25 (13) dicha cifra corresponde al número total de células de Paneth sobre las repeticiones.

TABLA N° 6:
INCREMENTO DE CÉLULAS DE PANETH EN YEYUNO DE CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella typhimurium*

	SANOS	ENFERMOS	INCREMENTO
YEYUNO	277	318	41

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 277 células de Paneth en cuyes sanos, mientras que en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella Typhimurium* fue de 318, es así que, existe un incremento de 41 células de Paneth en el yeyuno de cuyes sanos y enfermos experimentalmente.

Estos resultados discrepan con Cueva quien indica que, existe mayor número de Células de Paneth en el yeyuno e íleon en su trabajo realizado con alpacas en los primeros 21 días de edad pues nosotros obtuvimos como resultado que existe menor presencia de células de Paneth en el yeyuno, atribuyendo este resultado a que las Células de Paneth se presentan en mayor cantidad en el yeyuno cuando existe una enfermedad en transcurso, haciendo notable la inmunidad innata frente a una enfermedad inflamatoria como manifiesta Elpick D, Mahida R 2005 [99].

TABLA N° 7:
CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA DE ÍLEON DE CUYES SANOS

CANTIDAD DE ÍLEON SANOS	8
REPETICIONES	24
N° TOTAL DE CÉLULAS DE LAS CRIPTAS	561
N° DE CÉLULAS DE PANETH	264
PROMEDIO DE CÉLULAS PANETH/CRIPTA	11,0

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 3 criptas por cada íleon, teniendo un total de 24 observaciones o repeticiones.

Se contaron el total de células de todas las criptas (561) y el total de células de Paneth en todas las criptas (264).

El promedio de Células de Paneth por cripta en el íleon de cuyes sanos es de 11, dicha cifra corresponde al número total de células de Paneth sobre las repeticiones.

TABLA N° 8:
CÉLULAS DE PANETH POR CRIPTA EN ÍLEON DE CUYES ENFERMOS
EXPERIMENTALMENTE

CANTIDAD DE ÍLEON ENFERMOS	8
REPETICIONES	24
N° TOTAL DE CÉLULAS DE LAS CRIPTAS	494
N° DE CÉLULAS DE PANETH	353
PROMEDIO DE CÉLULAS PANETH/CRIPTA	14,71(15)

Fuente: Elaboracion propia

Se observaron 3 criptas por cada íleon (8), teniendo un total de 24 observaciones o repeticiones.

Se contaron el total de células de todas las criptas (494) y el total de células de Paneth en todas las criptas (353).

El promedio de Células de Paneth por cripta en el Íleon de cuyes enfermos es de 14,71(15) dicha cifra corresponde al número total de células de Paneth sobre las repeticiones.

.

TABLA N° 9
INCREMENTO DE CÉLULAS DE PANETH EN ÍLEON DE CUYES SANOS Y
CUYES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella*
typhimurium

	SANOS	ENFERMOS	INCREMENTO
ÍLEON	264	353	89

Fuente: Elaboracion propia

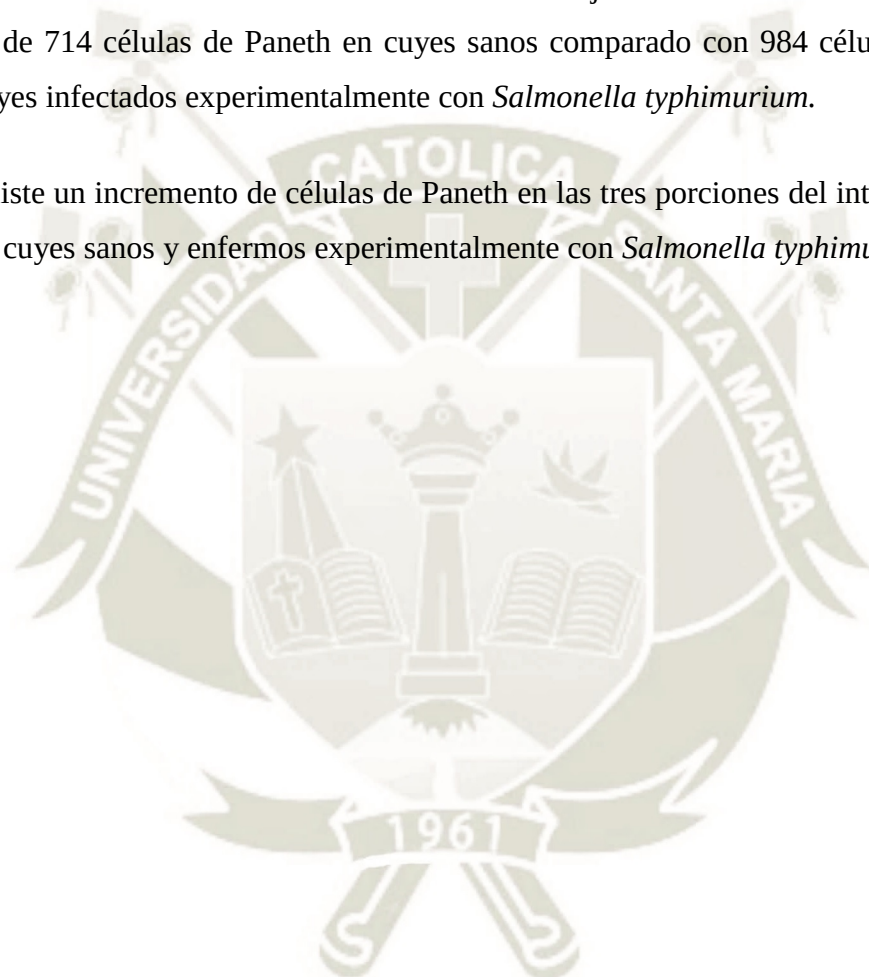
Se observaron 264 células de Paneth en cuyes sanos, mientras que en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella Typhimurium* fue de 353, es así que, existe un incremento de 89 células de Paneth en el Íleon de cuyes sanos y enfermos experimentalmente.

Estos resultados concuerdan con Martínez D et al 2009 [116] pues registro que existió aumento en el número de Células de Paneth frente a estímulos de Strés como también cita Vásquez [117] quien indica que, las células de Paneth están implicados en la defensa de la mucosa intestinal.

Además, Toth [108] indica que las células de Paneth no se alteran en animales eutérmicos en comparación a animales en hibernación afirmando nuestros resultados.

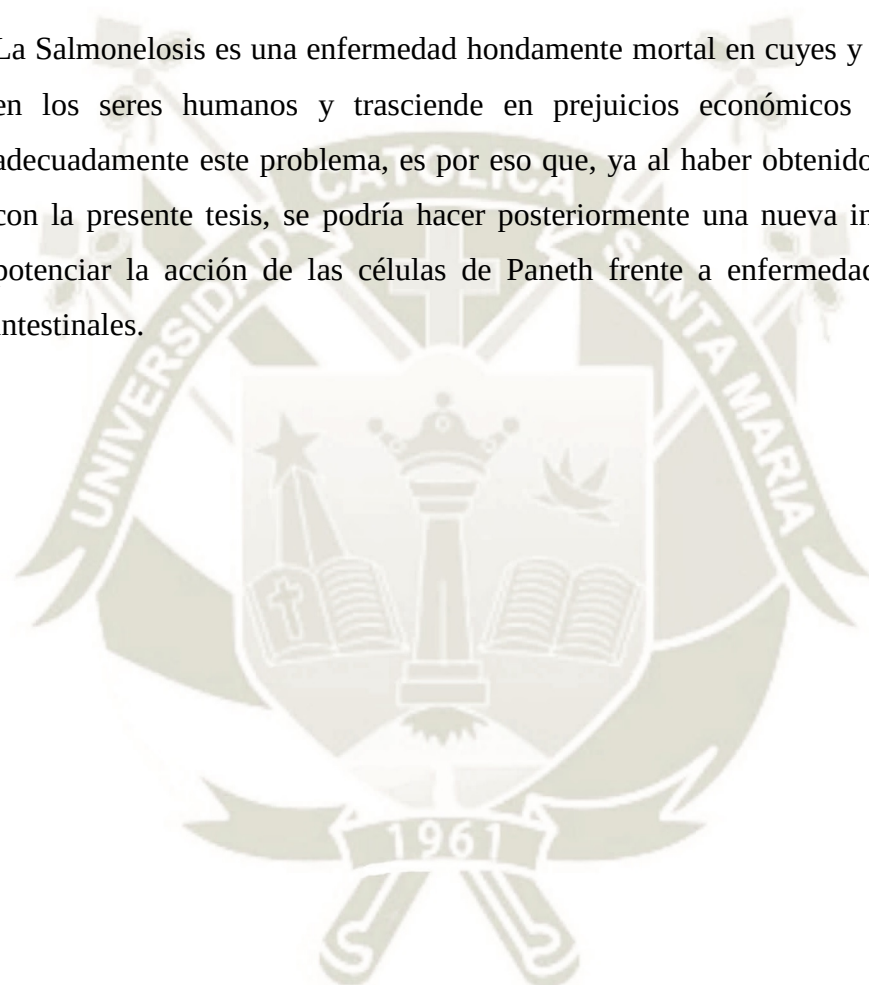
CONCLUSIONES

1. No existen cambios morfológicos de las células de Paneth presentes en el epitelio intestinal de cuyes enfermos experimentalmente con *Salmonella typhimurium*, comparado con las células de Paneth de cuyes sanos
2. El número total de las células de Paneth del conjunto del intestino delgado observadas es de 714 células de Paneth en cuyes sanos comparado con 984 células de Paneth en cuyes infectados experimentalmente con *Salmonella typhimurium*.
3. Existe un incremento de células de Paneth en las tres porciones del intestino estudiadas en cuyes sanos y enfermos experimentalmente con *Salmonella typhimurium*.



RECOMENDACIONES

1. La tinción más adecuada para identificar las Células de Paneth es la de Lendrum, por la coloración que le da a las mismas, es por eso que se recomienda difundir la Tinción de Lendrum para posteriores investigaciones.
2. La Salmonelosis es una enfermedad hondamente mortal en cuyes y del mismo modo en los seres humanos y trasciende en prejuicios económicos de no controlar adecuadamente este problema, es por eso que, ya al haber obtenido estos resultados con la presente tesis, se podría hacer posteriormente una nueva investigación para potenciar la acción de las células de Paneth frente a enfermedades inflamatorias intestinales.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. A. D. Grimont, F.-X. Weill (2007) “Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars”. 9a ed. Paris, Francia, Institut Pasteur. pp. 1-166.
- [2] L. Chauca (1997) “Producción de cuyes (*Cavia porcellus*)”. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-FAO, pp. 1-121.
- [3] Morales (2013). Sanidad en sistemas de crianza de cuyes. XXXVI Reunión científica anual de la Asociación de Producción animal: 38-44
- [4] C. Onyekaba (1983) “Clinical salmonellosis in a Guinea pig colony caused by a new *Salmonella* serotype, *Salmonella ochiogu*”. Lab. Anim. 17(3), 213-216.
- [5] A. Layme, R. Perales, A. Chavera, C. Gavidia, S. Calle (2011) “Lesiones anatomopatológicas en cuyes (*Cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* spp. Rev. Inv. Vet. Perú, 22(4), 369-376.
- [6] S. Coutinho, L. da Silva, I. Sinhorini, V. de Carvalho, E. da Costa (1994) “Surtos de salmonelose (*Salmonella typhimurium*) em *Cavia porcellus*”. Braz. J. Vet. Res. An. Sci. 31(3/4), 233-237.
- [7] J. Fournier, K. Knox, M. Harris, M. Newstein “Family outbreaks of nontyphoidal Salmonellosis following a meal of Guinea pigs”. Case Rep. Infect. Dis. doi.org/10.1155/2015/864640
- [8] I. Ramírez (1972) “Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*)”. Tesis de Médico Veterinario. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- [9] A. Matsuura, S. Morales, S. Calle, M. Ara (2010) “Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash”. Rev. Inv. Vet. Perú, 21(1), 93-99.

- [10] Keshab. S. 2006. Paneth cells: leukocytelike mediators of innate immunity in the intestine. *J Leukocyte Biol* 80:500-508.
- [11] Porter E, Bevins C, Ghosh D, Ganz T. 2002. The multifaceted Paneth cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59(1):156–170
- [12] Bevins CL. 2004. Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 20: 572-580.
- [13] Ouellette AJ. 2005. Paneth cell α defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol* 27: 33-146.
- [14] Hecht G. 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol* 277: 351-358.
- [15] Hornef MW, Putsep K, Karlsson J, Refai E, Andersson M. 2004. Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation. *Nat Immunol* 5: 836–843.
- [16] Burgos-Paz W, Ceron-Muñoz M, Solarte-Portilla C. 2011, Genetic diversity and population structure of the Guinea pig (*Cavia porcellus, rodetia, caviidae*) in Colombia. *Genet Mol Biol*. 34 (4):711-718.
- [17] Morales S, Mattos J, Calle S. 2007. Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella entérica* en cobayos. XXX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal, Cuzco-Perú.
- [18] INIA Instituto Nacional de Investigación Agraria, 2003. Proyectos de la DNI crianzas. En: http://www.portalagrario.gob.pe/Política/inia2_kAnrexoII.pdf.
- [19] Fano R. 1999. Evaluación de impactos de los programas de investigación del INIA. [Internet]. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe>

[20]Florián A.1998. Control de ectoparásitos en Cuyes. Resúmenes de experimentos en crianzas familiares, INIA.98(39):7-10 p.

[21]Gil V, 2007. Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. Arch.Latinoam. Prod.Anim.15(Supl.1):2016-2017.

[22] Jiménez R, Huamán R. 2010. Manual para el manejo de reproductores híbridos especializados en reproductores de Carne. El Mantaro, Perú: INCAGRO-ACRICUCEN-UNMSM.175p.

[23]FAO[Internet]Disponible en <http://www.fao.org/docrep/W6562S/w6562s07.htm>

[24]Caycedo, V.A.1993a. Producción de cuyes en Colombia.IV Symposium de especies animales Subutilizadas, Libro de conferencias UNELLEZ-AVPA, Barinas, Venezuela. 127 pags.

[25]FAO 1997 [Internet] Disponible en: www.fao.org/docrep/017/x4400s/x4400s.pdf

[26]Chauca L.1995. Sistemas de producción de cuyes. En: Serie Guía Didáctica: Crianza de Cuyes.INIA. Lima.Perú.38;77-85p.

[27] Ghoshal NG, Bal HS. 1989. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. In: Laboratory Animals 23, 21-29 p.

[28] Gómez B, Vergara V. 1993. Fundamentos de nutrición y alimentación. I Curso nacional de capacitación en crianzas familiares. págs. 38-50, INIA-EELM-EEBI.

[29] Holtenius K, Bjornhag G. 1985. The colonic separation mechanism in the Guinea pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). Comparative biochemistry and Physiology 82(4):537-542

- [30] Caballero A. 1992. Valor nutricional de la panca de maíz: consumo voluntario y digestibilidad en el cuy (*Cavia porcellus*). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú.
- [31] Ross M, Pawlina W. 2015. Histología, Texto y atlas correlación con Biología molecular y celular. Editorial Wolters Kluwer Health pag. 610-618
- [32] Geneser F. 2015. Histología. Editorial Panamericana 4ª edición pag 98- 106
- [33] Junqueira L.C, Carneiro J. 2015. Histología Básica 12va Edición 2015 Editorial Medica Panamericana 2015. Pag. 300
- [34] Ganz T, y Lehrer R. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. Curr. Opin. Immunol. 10:41-44.
- [35] Cheng H, Leblond C. 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four main epithelial cell types. Am. J. Anat. 141: 537-561.
- [36] Potten C, Loeffler M. 2008. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons from the crypt. Development. 110:1001-1020.
- [37] Ouellette A, Satchell D, Hsieh M. 2003. Characterization of luminal Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine: Attenuated antimicrobial activities of peptides with truncated amino termini. J Biol Chem salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. Nature. 422:522-526.
- [38] Garabedian EM, Roberts JM, Nevin MS, Gordon JI. 1997. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. J Biol Chem 272: 23729-2374.
- [39] Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. 2002. The multifaceted Paneth cells. Cellular and Molecular Life Sciences 59(1): 156–170.

- [40] L Bry, Falk P, Huttner K, Ouellette A, Midtvedt T, Gordon JI. 1994. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 91: 10335- 10339.
- [41] Rubin D, Swietlicki K, Roth A, Gordon J. 1992. Use of fetal intestinal isografts from normal and transgenic mice to study the programming of positional information along the duodenal-to-colonic axis. J. Biol. Chem. 267: 15122-15133.
- [42] Kamal M, Wakelin D, Ouellette A, Smith A, Podolsky D, Mahida Y. 2001. Mucosal T cells regulate Paneth and intermediate cell numbers in the small intestine of T. Spiralis-infected mice. Clin. Exp. Immunol. 126:117-125.
- [43] Chero A., Rosadio R., Marcelo G., Diaz G., Jiménez R., Castro Y., Maturango L. 2017 Identificación molecular de Salmonella typhimurium en cuyes al primer parto mediante la técnica de PCR Múltiple.
- [44] Ameghino EF. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*): 3er boletín extraordinario. Lima: IVITA. 260 p.
- [45] Bustamante J. 1993. Producción de cuyes. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 259 p.
- [46] Garmendia MM, Serrad S, Alezones F. 2000. Salmonelosis en animales de laboratorio. FONAIAP [Internet], [noviembre 2000]. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.pe/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd68/texto/mgarmendia.htm>
- [47] Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. Salmonella nomenclature. Journal of Clinical Microbiology 38: 2465-2467.
- [48] Figueroa I, Verdugo A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella spp. Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM 47: 25-42.

- [49] Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ. 2006. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. ed. Zaragoza: ACRIBIA SA. 134 p.
- [50] Parra M, Durango J, Mattar S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. MVZ-Cordoba 7: 187 – 200.
- [51] Stellmacher W. 1981. Infecciones por Salmonellas. En: Ver J, eds. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Ed. Zaragoza: ACRIBIA. p 59-81.
- [52] Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2010. Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 26ª ed. México: Manual Moderno. 277p.
- [53] Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino, y equino. 9ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill. 959p.
- [54] Flores C R. 1981. Epizootiología de la salmonelosis en bovinos, porcinos y aves. Ciancia Veterinarian 3: 147-175.
- [55] Garber L, Smeltzer M, Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. 2003. Salmonella enterica serotipe Enteritidis in table egg layer house environments and in mice in U. S. layer houses and associated risk factors. Avian Dis.47: 134-142.
- [56] Meerburg BG, Kijlstra A. 2007. Role of rodents in transmission of Salmonella and Campylobacter. J Sci Food Agric 87: 2774-2781.
- [57] Acha P, Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3º edición. Vol 2. OPS-Washington: 240 p.
- [58] Mejía W. 2003. Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis para optar el grado de Doctor. Barcelona. Universidad Autónoma de Barcelona. 98 p.

[59] Jubb K, Kennedy P, Palmer N. 1990. Patología de los animales domésticos. 3ª ed. Tomo II Uruguay: Agropecuaria hemisferio sur. 653p.

[60] Sánchez M, Cardona N. 2003. Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal. Infectio-Asociación colombiana de infectología 7: 22-29.

[61] Darwin K, Miller V. 1999. Molecular basis of the interaction of salmonella with the intestinal mucosa. Clinical Microbiology Reviews 12: 405-428.

[62] Santos R, Tsolis R, Bäumlér A, Adams I. 2003. Patogénesis of salmonella- induced enteritis. Braziliam Journal of Medical and Biological Reasearch 36:3-12

[63] Tükel C, Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Akcelik M, Bäumlér AJ. 2006.

[64] Ohl M, Miller S. 2001. Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. Annu Rev Med 52: 259-27.

[65] Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tükel C, Akcelik M, Bäumlér AJ. 2006. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects af typhoid fever pathogenesis. Infect Immun 74: 19-27.

[66] Ralph a. Giannella 1978 Importance of the Intestinal Inflammatory Reaction in Salmonella-Mediated Intestinal Secretion.

[67] Zhang S, Kingsley R, Santos R, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, Nunes J, Tsalois R, Adams L, Bäumlér A. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotipe *Typhimurium*-induced diarrhea. Infection and Immunity 71: 1-12.

[68] Beneneson S, Raveh D, Schlesinger Y, Alberton J, Rudensky B, Hadas-Halpern I, Yinnon AM. 2002. The risk of vascular infection in adult patients with nontyphi *Salmonella* bacteremia. Am J Med. 110: 60-63.

[69] Hensel M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol. 294: 95-102.

[70] Ouellette A, Satchell P, Hsieh M. 2000. Characterization of luminal Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine: Attenuated antimicrobial activities of peptides with truncated amino termini. J Biol Chem. 275:33969–33973.

[71] Ouellette y Selsted, 1996 Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria.

[72] Bjerknes M, Cheng H 1981 The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from Paneth cells in the newborn mouse.

[73] Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P. 2004. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. J. Cell Biol. 166:37–47.

[74] Spokony R, Aoki Y, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint- Jeannet J. 2002. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. Development. 129:421–432.

[75] Stolt C, Lommes P, Sock E, Chaboissier M, Schedl A, Wegner M. 2003. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. Genes Dev. 17:1677–1689.

[76] Akiyama, H. Chaboissier M, Behringer, R.R, Rowitch D, Schedl, A, Epstein, J A, de Crombrughe, B (2004) Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 6502-6507.

[77] Vidal V, Chaboissier M, Lutzkendorf S, Cotsarelis G, Mill P, Hui C, Ortonne N, Ortonne J, Schedl A. 2005. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. Curr. Biol. 15:1340–1351.

[78] Seymour P, Freude K, Tran M, Mayes E, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:1865–1870.

[79] Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P. 2004. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. J. Cell Biol. 166:37–47.

[80] Bastide P, Darido C, Pannequin J, Kist R, Robine S. 2007. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. J. Cell Biol. 178:635–48.

[81] Mori-Akiyama Y, Van Den Born M, van E, Hamilton S, Adams H. 2007. SOX9 is required for the differentiation of Paneth cells in the intestinal epithelium. Gastroenterology 133:539–46.

[82] Batlle E, Henderson J, Beghtel H, van den Born, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H. 2002. β -Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. Cell. 111:251–263.

[83] Klockars M, Reitamo S. 1975. Tissue distribution of lysozyme in man. J Histochem Cytochem. 23:932–940.

[84] H B Coutinho, H Carmona da Mota, V B Coutinho, T I Robalinho, A F Furtado, E Walker, G King, Y R Mahida, H F Sewell, D Wakelin. 1998. Absence of lysozyme (muramidase) in the intestinal Paneth cells of newborn infants with necrotising enterocolitis. 51:512–514

[85] Harwig S, Tan L, Qu X. 1995. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. J Clin Invest. 95:603-610.

- [86] Nissen-Meyer J, Nes I. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167:67-77.
- [87] Selsted M, Ouellette A. 1995. Defensins in granules of phagocytic and non- phagocytic cells. *Trends Cell Biol.* 5:114-119.
- [88] Cunliffe R, Mahida Y. 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol.* 75:49-58.
- [89] Ayabe T, Satchell D, Wilson C, Parks W, Selsted M, Ouellette A. 2000. Secretion of microbicidal defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* 1:113-118.
- [90] Huttner K, Ouellette A. 1994. A family of defensin-like genes codes for diverse cysteine-rich peptides in mouse Paneth cells. *Genomics.* 24:99-109.
- [91] Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, Niwa-Kawakita M, Laurent-Puig P, Kahn A, Robine S, Perret C. 2005. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development.* 132:1443-51.
- [92] Var Flier L, Clevers H. 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71:241-60.
- [93] Jones D, Bevins C. 1992. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem.* 267:23216-23225.
- [94] Ouellette A, Lualdi J. 1990. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small intestine and cells of myeloid origin. *J Biol Chem.* 265:9831-9837.
- [95] Lin M, Munshi I, Ouellette A. 1992. The defensin-related murine CRS1C gene: expression in Paneth cells and linkage to Defcr, the cryptdin locus. *Genomics.* 14:363-8.

- [96] Wilson C, Ouellette A, Satchell D, Ayabe T, Lopez-Boado Y, Stratman J, Hultgren S, Matrisian L, Parks W. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 286:113-117.
- [97] Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee S, Wilk D, Drazba J, Yadav S, Crabb J, Ganz T, Bevins C. 2002. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol*. 3:583-590.
- [98] Sawada M, Takahashi K, Sawada S, Midorikawa O. 1991. Selective killing of Paneth cells by intravenous administration of dithizone in rats. *Int. J. Exp. Pathol*. 72:407-421.
- [99] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 119: 493-501.
- [100] Meister M, Lemaitre, Hoffmann J. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays*. 19: 1019-1026.
- [101] Zasloff M. 1992. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol*. 4:3-7.
- [102] Dimopoulos G, Richman H, Muller M, Kafatos F. 1997. Molecular immune. responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:11508-11513.
- [103] Russell V, Dunn P. 1996. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J. Infect*. 42: 65-71.
- [104] Bevins C. 2004. Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol*. 20:572-580.
- [105] Elphick D, Mahida R. 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*. 54:1802-1809.

- [106] Wehkamp J, Salzman N, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras R, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R. 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:18129-34.
- [107] Salzman N, Ghosh D, Huttner K, Paterson Y, Bevins C. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*. 422:522-6.
- [108] Darmoul D, Ouellette A. 1996. Positional specificity of defensin gene expression reveals Paneth cell heterogeneity in mouse small intestine. *Am J Physiol*. 271: G68-74.
- [109] Patil A, Hughes A, Zhang G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian alpha-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics*. 20:1-11.
- [110] Keren D, Elliott H, Brown G, Yardley J. 1975. Atrophy of villi with hypertrophy and hyperplasia of Paneth cells in isolated (thiry-Vella) ileal loops in rabbits. Light-microscopic studies. *Gastroenterology*. 68:83-93.
- [111] Lewin, 1969 The Paneth cell in disease.
- [112] Rodning C, Erlandsen S, Wilson I, Carpenter A. 1982. Light microscopic morphometric analysis of rat ileal mucosa: II. Component quantification of Paneth cells. *Anat Rec*. 204:33-38.
- [113] Ehrmann J, Malinsky J, Gregar I. 1990. Paneth cells and coeliac disease-quantitative, morphometric analysis. *Acta Univ Palacki Olomic Fac Med*. 126:187-201.
- [114] Toth D. 1980. Ultrastructural changes in Paneth cells during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *Cell Tissue Res* 1980; 211:293-301.

- [115] Takehana K, Masty J, Yamaguchi M, Kobayashi A, Yamada O, Kuroda M. 1998. Fine structural and histochemical study of equine Paneth cells. *Anat Histol Embryol* 27:125-9.
- [116] Ergün E, Ergün L, Asti R, Kürüm A. 2003. Light and electronmicroscopic morphology of Paneth cells in the sheep small intestine. *Rev Med Vet.* 154:351-5.
- [117] Lira, 2010 Luminal Bacteria Recruit CD103+ Dendritic Cells into the Intestinal Epithelium to Sample Bacterial Antigens for Presentation.
- [118] Satoh Y, Yamano M, Matsuda M, Ono K. 1990. Ultrastructure of Paneth cells in the intestine of various mammals. *J Electron Microsc Tech* 16:69–80.
- [119] Megiás M, Molist P, Pombal M 2018. Atlas de Histología animal y vegetal.
- [120] Cueva, S.; Rodríguez, J.; Ayón, M.; Zanuzzi, C.; Barbeito, C.; Falcón, N. y Vásquez, M. C. (2012). Identificación de las células de Paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 138-146, nov. 2012. ISSN 1682-3419. Disponible en: <<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/893>>. Fecha de acceso: 11 jun. 2016 doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v23i2.893>.
- [121] Bedini, O.; Naves, A.; San Miguel, P.; Quispe, A. y Guida, C. 2014. Colitis ulcerosa y células de Paneth metaplásicas. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, vol. 44, núm. 4, diciembre, 2014, pp. 285-289. Sociedad Argentina de Gastroenterología. Buenos Aires, Argentina.
- [122] Martínez, D.; Camacho, J.; Villanueva, I. y Becerril, A. 2009. Cambios morfológicos producidos por el estrés sobre la población de células de Paneth.
- [123] Vásquez Cachay, Pebe Gomez, Rodriguez Gutierrez, Lira Mejia et al 2014 Paneth Cell Identification in the Small Intestine of Guinea Pig Offsprings (*Cavia porcellus*)

[124] Shi J. 2007 Defensins and Paneth cells in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel*; 13:1284-1292.

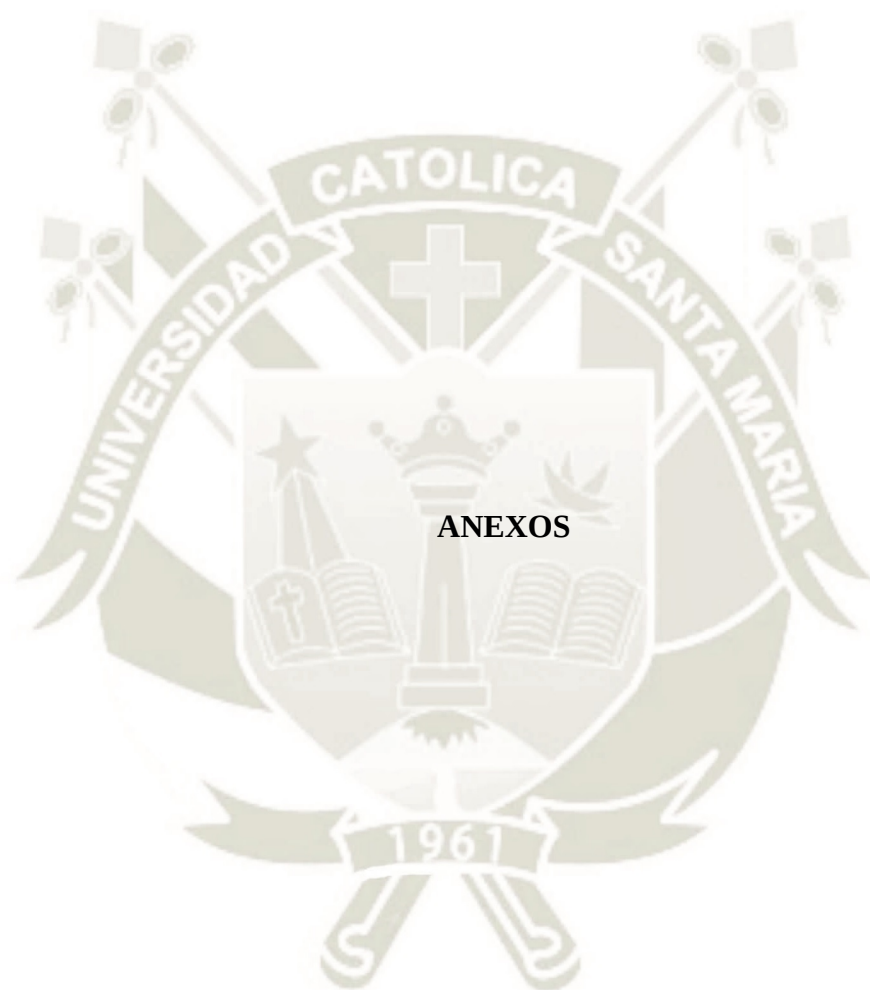
[125] Ralph a. Giannella 1978 Importance of the Intestinal Inflammatory Reaction in Salmonella-Mediated Intestinal Secretion.

[126] Hazel Cheng J. Merzel C. P. Leblond 1969. Renewal of Paneth cells in the small intestine of the mouse.

[127] INEI, 2014.

[128] Montalvo C. 2010 Técnica Histológica agosto de 2010.

[129] Instituto de Patología de las Fuerza Armadas de los Estados Unidos de América, 1995, págs. 153, 154.



ANEXO N° 1: CONSTANCIA DE LABORATORIO



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO ACADEMICO
DE MICROBIOLOGIA Y PATOLOGIA

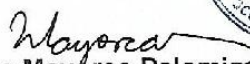
CONSTANCIA

El que suscribe, Directora del Departamento de Microbiología y Patología de la Facultad de Medicina de la UNSA, deja constancia que en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la UNSA, se realizaron los siguientes cortes histológicos: 48 láminas con coloración hematoxilina-eosina, 48 láminas con coloración PAS y 48 láminas sin coloración (total 144 láminas), sin lectura; desde el 15 de abril hasta el 25 de mayo del 2018; para la tesis titulada **“Evaluación morfológica de las células de Paneth del epitelio intestinal de cuyes (*Cavia porcellus*) en recría, infectados experimentalmente con *Salmonella entérica typhimurium*. Arequipa 2018”** cuya autora es: Wendy Milagros Bravo Luna, para optar el título de Magister en Producción y Salud Animal de la Escuela de Postgrado de la UCSM.

Se extiende la presente constancia a solicitud de las interesadas para los fines consiguientes.

Arequipa 2018 julio 30


Blga. Milade Lazo Vera
Encargada de Laboratorio
de Patología


Dra. Blanca Mayrca Palomino
Directora del Departamento Académico
Microbiología y Patología



ANEXO N° 2: MATRICES DE SISTEMATIZACIÓN CUYES SANOS

ABREVIACIÓN	N°
DE MUESTRAS	
CUYES SANOS	
TECNICA	
LENDRUM	
S.D.1	CUY 1 SANO DUODENO
S.Y.1	CUY 1 SANO YEYUNO
S.I.1	CUY 1 SANO ÍLEON
S.D.2	CUY 2 SANO DUODENO
S.Y.2	CUY 2 SANO YEYUNO
S.I.2	CUY 2 SANO ÍLEON
S.D.3	CUY 3 SANO DUODENO
S.Y.3	CUY 3 SANO YEYUNO
S.I.3	CUY 3 SANO ÍLEON
S.D.4	CUY 4 SANO DUODENO
S.Y.4	CUY 4 SANO YEYUNO
S.I.4	CUY 4 SANO ÍLEON
S.D.5	CUY 5 SANO DUODENO
S.Y.5	CUY 5 SANO YEYUNO
S.I.5	CUY 5 SANO ÍLEON
S.D.6	CUY 6 SANO DUODENO
S.Y.6	CUY 6 SANO YEYUNO
S.I.6	CUY 6 SANO ÍLEON
S.D.7	CUY 7 SANO DUODENO
S.Y.7	CUY 7 SANO YEYUNO
S.I.7	CUY 7 SANO ÍLEON
S.D.8	CUY 8 SANO DUODENO
S.Y.8	CUY 8 SANO YEYUNO
S.I.8	CUY 8 SANO ÍLEON

ANEXO N° 3 MATRICES DE SISTEMATIZACIÓN CUYES ENFERMOS

ABREVIACIÓN DE
MUESTRAS CUYES
ENFERMOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE

E.D.1	CUY 1 ENFERMO DUODENO
E.Y.1	CUY 1 ENFERMO YEYUNO
E.I.1	CUY 1 ENFERMO ÍLEON
E.D.2	CUY 2 ENFERMO DUODENO
E.Y.2	CUY 2 ENFERMO YEYUNO
E.I.2	CUY 2 ENFERMO ÍLEON
E.D.3	CUY 3 ENFERMO DUODENO
E.Y.3	CUY 3 ENFERMO YEYUNO
E.I.3	CUY 3 ENFERMO ÍLEON
E.D.4	CUY 4 ENFERMO DUODENO
E.Y.4	CUY 4 ENFERMO YEYUNO
E.I.4	CUY 4 ENFERMO ÍLEON
E.D.5	CUY 5 ENFERMO DUODENO
E.Y.5	CUY 5 ENFERMO YEYUNO
E.I.5	CUY 5 ENFERMO ÍLEON
E.D.6	CUY 6 ENFERMO DUODENO
E.Y.6	CUY 6 ENFERMO YEYUNO
E.I.6	CUY 6 ENFERMO ÍLEON
E.D.7	CUY 7 ENFERMO DUODENO
E.Y.7	CUY 7 ENFERMO YEYUNO
E.I.7	CUY 7 ENFERMO ÍLEON
E.D.8	CUY 8 ENFERMO DUODENO
E.Y.8	CUY 8 ENFERMO YEYUNO
E.I.8	CUY 8 ENFERMO ÍLEON

ANEXO N° 4: RESULTADOS CON LA TINCIÓN DE LENDRUM EN EL DUODENO DE CUYES SANOS

DUODENO DE CUYES SANOS									
	CONTEO CCP 1	CP 1	% CUY 1	CONTEO CCP 2	CP2	% CUY 2	CONTEO CCP3	CP3	%CUY3
DUODENO 1	21	4	19	13	6	46	19	7	37
DUODENO 2	21	8	38	17	10	59	18	8	44
DUODENO 3	18	8	44	12	5	42	23	9	39
DUODENO 4	12	4	33	27	7	26	13	3	23
DUODENO 5	15	7	47	17	10	59	18	8	44
DUODENO 6	14	7	50	18	10	56	14	8	57
DUODENO 7	14	6	43	14	8	57	10	3	30
DUODENO 8	14	7	50	18	10	56	20	10	50
PROMEDIOS	16	6	41	17	8	50	17	7	41

ANEXO N° 5: RESULTADOS CON LA TINCIÓN DE LENDRUM EN EL DUODENO DE CUYES ENFERMOS

DUODENO DE CUYES ENFERMOS EXPERIMENTALMENTE									
	CONTEO CCP 1	CP 1	% CUY 1	CONTEO CCP 2	CP2	% CUY 2	CONTEO CCP3	CP3	%CUY3
DUODENO 1	15	10	67	23	14	61	18	9	50
DUODENO 2	22	17	77	22	16	73	25	14	56
DUODENO 3	23	16	70	16	10	63	17	12	71
DUODENO 4	18	15	83	20	13	65	20	11	55
DUODENO 5	16	10	63	20	17	85	20	13	65
DUODENO 6	20	17	85	21	16	76	18	13	72
DUODENO 7	20	13	65	13	9	69	14	10	71
DUODENO 8	19	12	63	14	10	71	22	16	73
PROMEDIO	19	14	72	19	13	70	19	12	64

ANEXO N° 6: RESULTADOS CON LA TINCIÓN DE LENDRUM EN EL YEYUNO DE CUYES SANOS

YEYUNO DE CUYES SANOS									
	CONTEO CCP 1	CP 1	% CUY 1	CONTEO CCP 2	CP2	% CUY 2	CONTEO CCP3	CP3	%CUY3
YEYUNO 1	22	14	64	15	20	75	16	10	63
YEYUNO 2	21	9	43	36	17	212	19	7	37
YEYUNO 3	16	8	50	30	10	300	17	9	53
YEYUNO 4	15	7	47	19	12	158	30	10	33
YEYUNO 5	22	15	68	21	11	191	20	13	65
YEYUNO 6	19	13	68	31	11	282	19	10	53
YEYUNO 7	19	12	63	21	10	210	18	11	61
YEYUNO 8	21	14	67	19	11	173	22	13	59
PROMEDIOS	19	12	59	24	13	200	20	10	53

ANEXO N° 7: RESULTADOS CON LA TINCIÓN DE LENDRUM EN EL YEYUNO DE CUYES ENFERMOS

YEYUNO DE CUYES ENFERMOS EXPERIMENTALMENTE									
	CONTEO CCP 1	CP 1	% CUY 1	CONTEO CCP 2	CP2	% CUY 2	CONTEO CCP3	CP3	%CUY3
YEYUNO 1	25	15	60	30	14	47	22	15	68
YEYUNO 2	29	13	45	31	18	58	30	15	50
YEYUNO 3	30	11	37	30	7	23	25	8	32
YEYUNO 4	25	19	76	20	12	60	21	13	62
YEYUNO 5	30	12	40	30	13	43,3	30	10	33
YEYUNO 6	22	16	73	15	12	80	22	17	77
YEYUNO 7	25	11	44	20	16	80	25	11	44
YEYUNO 8	30	11	37	18	13	72	20	16	80
PROMEDIO	27	14	51	24	13	58	24	13	56

ANEXO N° 8: RESULTADOS CON LA TINCIÓN DE LENDRUM EN EL ÍLEON DE CUYES SANOS

ÍLEON DE CUYES SANOS									
	CONTEO CCP 1	CP 1	% CUY 1	CONTEO CCP 2	CP2	% CUY 2	CONTEO CCP3	CP3	%CUY3
ÍLEON 1	20	13	65	23	11	48	19	9	47
ÍLEON 2	26	10	38	31	11	35	10	3	30
ÍLEON 3	26	12	46	22	10	45	21	14	67
ÍLEON 4	28	10	36	33	11	33	35	10	29
ÍLEON 5	22	13	59	32	11	34	20	12	60
ÍLEON 6	23	14	61	16	10	63	30	12	40
ÍLEON 7	18	11	61	24	9	38	24	12	50
ÍLEON 8	19	12	63	20	10	50	19	14	74
PROMEDIO	23	12	54	25	10	43	22	11	50

ANEXO N°9: RESULTADOS CON LA TINCIÓN DE LENDRUM EN EL ÍLEON DE CUYES ENFERMOS

ÍLEON DE CUYES ENFERMOS EXPERIMENTALMENTE									
	CONTEO CCP 1	CP 1	% CUY 1	CONTEO CCP 2	CP2	% CUY 2	CONTEO CCP3	CP3	%CUY3
ÍLEON 1	21	15	71	21	18	86	20	16	80
ÍLEON 2	22	14	64	19	13	68	22	15	68
ÍLEON 3	20	14	70	22	16	73	19	11	58
ÍLEON 4	25	17	68	31	25	81	19	14	74
ÍLEON 5	22	12	55	21	14	67	22	11	50
ÍLEON 6	18	13	72	20	15	75	19	11	58
ÍLEON 7	20	16	80	18	11	61	19	14	74
ÍLEON 8	19	15	79	14	20	143	21	13	62
PROMEDIO	21	15	70	21	17	82	20	13	65

ANEXO N° 10: CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Se realizó la estadística descriptiva mediante las medidas de tendencia central para comparar los valores de **EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE PANETH DEL EPITELIO INTESTINAL DE CUYES (*Cavia porcellus*) EN RECRÍA INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella typhimurium***, se realizó la prueba t de Student con muestras independientes con un nivel de significancia del 5%.

Los datos fueron tabulados en primer momento en Excel, para después ser convertidos en la matriz en SPSS programa que procesó los datos.

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

DUODENO SANO	DUODENO ENFERMO	YEYUNO SANO	YEYUNO ENFERMO	ÍLEON SANO	ÍLEON ENFERMO
21	15	22	25	20	21
21	22	21	29	26	22
18	23	16	30	26	20
12	18	15	25	28	25
15	16	22	30	22	22
14	20	19	22	23	18
14	20	19	25	18	20
14	19	21	30	19	19
13	23	15	30	23	21
17	22	36	31	31	19
12	16	30	30	22	22
27	20	19	20	33	31
17	20	21	30	32	21
18	21	31	15	16	20
14	13	21	20	24	18
18	14	19	18	20	14
19	18	16	22	19	20
18	25	19	30	10	22
23	17	17	25	21	19
13	20	30	21	35	19
18	20	20	30	20	22
14	18	19	22	30	19
10	14	18	25	24	19
20	22	22	20	19	21

Resultado1 [Documento1] - IBM SPSS Statistics Visor

Archivo Editar Ver Datos Transformar Insertar Formato Analizar Marketing directo Gráficos Utilidades Ventana Ayuda

GET
FILE='G:\Tesis2017\CUYES WENDY\matriz 3.sav'.
DATASET NAME ConjuntoDatos1 WINDOW=FRONT.
FRECUENCIES VARIABLES=ileosanos ileonenfermos Yeyunosanos Yeyunoenfermos Duodenosanos
Duodenoenfermos
/FORMAT=NOTABLE
/STATISTICS=STDDEV MINIMUM MAXIMUM MEAN
/ORDER=ANALYSIS.

Frecuencias

[ConjuntoDatos1] G:\Tesis2017\CUYES WENDY\matriz 3.sav

Estadísticos

	ileosanos	ileonenfermos	Yeyunosanos	Yeyunoenfermos	Duodenosanos	Duodenoenfermos
Media	23,38	20,58	21,17	25,21	16,67	19,00
Desviación estándar	5,91	3,03	5,36	4,75	3,97	3,18
Máximo	35,00	31,00	36,00	31,00	27,00	25,00
Mínimo	10,00	14,00	15,00	15,00	10,00	13,00
N Válido	24	24	24	24	24	24

T-TEST PAIRS=ileosanos WITH ileonenfermos (PAIRED)
/CRITERIA=CI (.9500)
/MISSING=ANALYSIS.

Prueba T

Efectúe una doble pulsación para activar

Efectúe una doble pulsación para editar Tabla dinámica

IBM SPSS Statistics Processor está listo

Unicode: ON H: 222. W: 902 pt

14:21 04/01/2019

Resultado1 [Documento1] - IBM SPSS Statistics Visor

Archivo Editar Ver Datos Transformar Insertar Formato Analizar Marketing directo Gráficos Utilidades Ventana Ayuda

		Media	N	Desviación estándar	error estándar
Par 1	ileosanos	23,3750	24	5,91103	1,20658
	ileonenfermos	20,5833	24	3,03482	,61948
Par 2	Yeyunosanos	21,1667	24	5,36224	1,09456
	Yeyunoenfermos	25,2083	24	4,74552	,96867
Par 3	Duodenosanos	16,6667	24	3,97456	,81130
	Duodenoenfermos	19,0000	24	3,17600	,64830

Prueba de muestras emparejadas

Diferencias emparejadas

		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	ileosanos - ileonenfermos	2,79167	5,98534	1,22175	-,26428	5,31905	2,285	23	,032
Par 2	Yeyunosanos - Yeyunoenfermos	-4,04167	7,28596	1,48724	-7,11826	-,96508	-2,718	23	,012
Par 3	Duodenosanos - Duodenoenfermos	-2,33333	4,49799	,91815	-4,23267	-,43400	-2,541	23	,018

Prueba de muestras emparejadas

Diferencias emparejadas

		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	ileosanos - ileonenfermos	2,79167	5,98534	1,22175	-,26428	5,31905	2,285	23	,032

IBM SPSS Statistics Processor está listo

Unicode: ON H: 162. W: 438 pt

14:24 04/01/2019

MATRIZ DE DATOS

Estadísticos

	Íleonsanos	Íleonenfermos	Yeyunosanos	Yeyunoen-fermos	Duodenosanos	Duodenoenfermos
Media	23,38	20,58	21,17	25,21	16,67	19,00
Desviación estándar	5,91	3,03	5,36	4,75	3,97	3,18
Máximo	35,00	31,00	36,00	31,00	27,00	25,00
Mínimo	10,00	14,00	15,00	15,00	10,00	13,00
N Válido	24	24	24	24	24	24

Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Íleonsanos	23,3750	24	5,91103	1,20658
	Íleonenfermos	20,5833	24	3,03482	,61948
Par 2	Yeyunosanos	21,1667	24	5,36224	1,09456
	Yeyunoenfermos	25,2083	24	4,74552	,96867
Par 3	Duodenosanos	16,6667	24	3,97456	,81130
	Duodenoenfermos	19,0000	24	3,17600	,64830

Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	Íleonsanos - Íleonenfermos	2,79167	5,98534	1,22175	,26428	5,31905	2,285	23	,032
Par 2	Yeyunosanos - Yeyunoenfermos	- 4,04167	7,28596	1,48724	-7,11826	-,96508	-2,718	23	,012
Par 3	Duodenosanos - Duodenoenfermos	- 2,33333	4,49799	,91815	-4,23267	-,43400	-2,541	23	,018

TABLA N° 10:
DATOS ESTADÍSTICOS DE DUODENO EN CUYES SANOS Y ENFERMOS
EXPERIMENTALMENTE

ESTADÍSTICOS	SANOS	ENFERMOS
MEDIA	16,67	19,00
DESVIACIÓN	3,97	3,18
VARIANZA	15,80	10,09
MÁXIMO	27,00	25,00
MÍNIMO	10,00	13,00
TAMAÑO	24	24
	t=2.54	P=0.02

En la tabla N° 10 según la prueba t de student ($t=2.54$) muestra que la presencia de células de Paneth en cuyes sanos e infectados con *Salmonella typhimurium* en el duodeno presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Asimismo, se observa que el promedio de las células de Paneth presentes en el duodeno en cuyes sanos fue de 16.67 células de Paneth, mientras que el promedio de células de Paneth en cuyes con *Salmonella typhimurium* fue de 19 Células de Paneth.

TABLA N° 11:
DATOS ESTADISTICOS YEYUNO CUYES SANOS Y ENFERMOS

ESTADÍSTICOS	SANOS	ENFERMOS
MEDIA	21,17	25,21
DESVIACIÓN	5,36	4,75
VARIANZA	28,75	22,52
MÁXIMO	15,00	31,00
MÍNIMO	36,00	15,00
TAMAÑO	24	24
t=2.72		P=0.01

En la tabla N° 11 según la prueba t de student ($t=2.72$) muestra que la presencia de células de Paneth en cuyes sanos e infectados con *Salmonella typhimurium* en el yeyuno presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Asimismo, se observa que, el promedio de las células de Paneth presentes en el yeyuno en cuyes sanos fue de 21.17 células de Paneth, mientras que el promedio de células de Paneth en cuyes con *Salmonella typhimurium* fue de 25.21 células de Paneth.

TABLA N° 12:
DATOS ESTADISTICOS ÍLEON CUYES SANOS Y ENFERMOS

ESTADÍSTICOS	SANOS	ENFERMOS
MEDIA	23,38	20,58
DESVIACIÓN	5,91	3,03
VARIANZA	34,94	9,21
MÁXIMO	35,00	31,00
MÍNIMO	10,00	14,00
TAMAÑO	24	24
t=2.28		P=0.02

En la tabla N°.12 según la prueba t de student ($t=2.28$) muestra que la presencia de células de Paneth en cuyes sanos e infectados con *Salmonella typhimurium* en el íleon presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Asimismo, se observa que el promedio de las células de Paneth presentes en el íleon en cuyes sanos fue de 23.38 células de Paneth, mientras que el promedio de células de Paneth en cuyes con *Salmonella typhimurium* fue de 20.58 células de Paneth.

**ANEXO N° 12: GRAFICAS COMPARANDO DISTINTAS PARTES DEL
INTESTINO EN CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE *Salmonella typhimurium***

**GRÁFICO N° 1:
NÚMERO DE CÉLULAS DE PANETH EN DUODENO DE CUYES SANOS Y
CUYES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella*
*typhimurium***

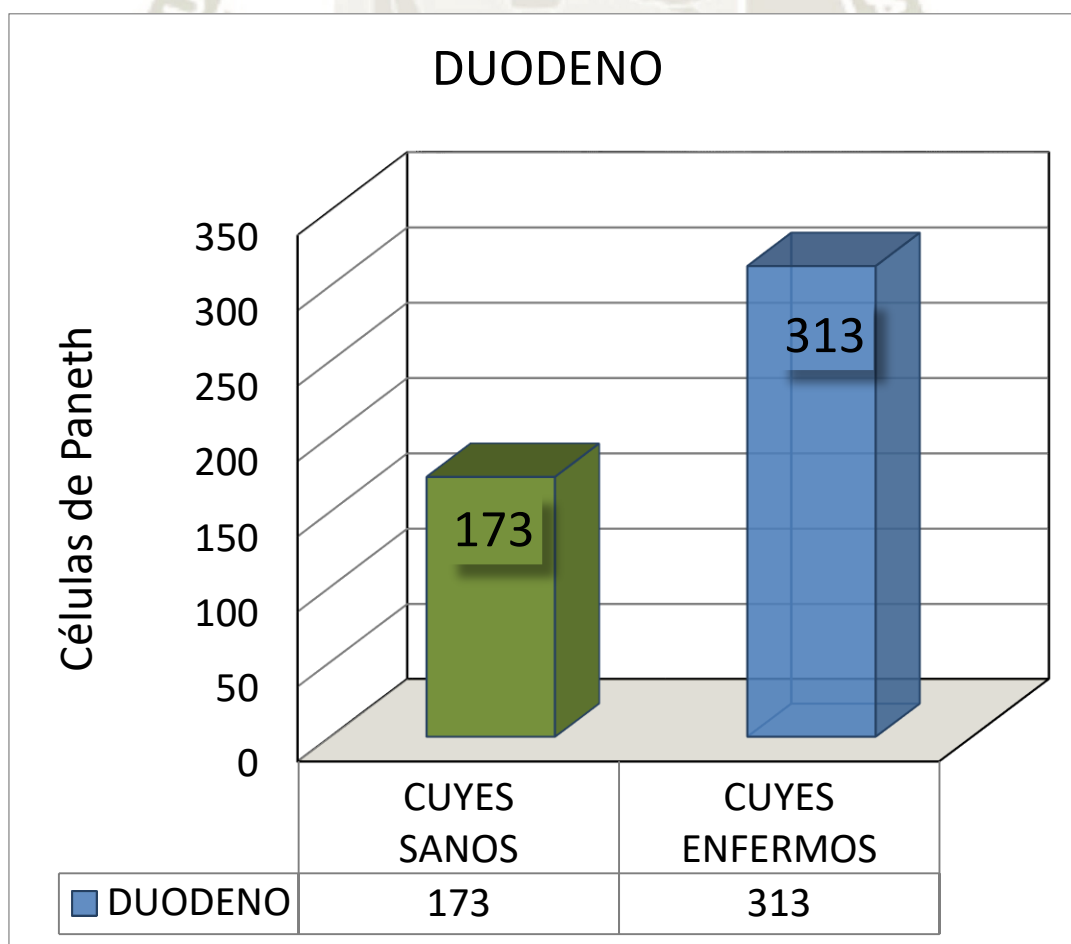


GRÁFICO N° 2:
NÚMERO DE CÉLULAS DE PANETH EN YEYUNO DE CUYES SANOS Y
CUYES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Salmonella*
typhimurium

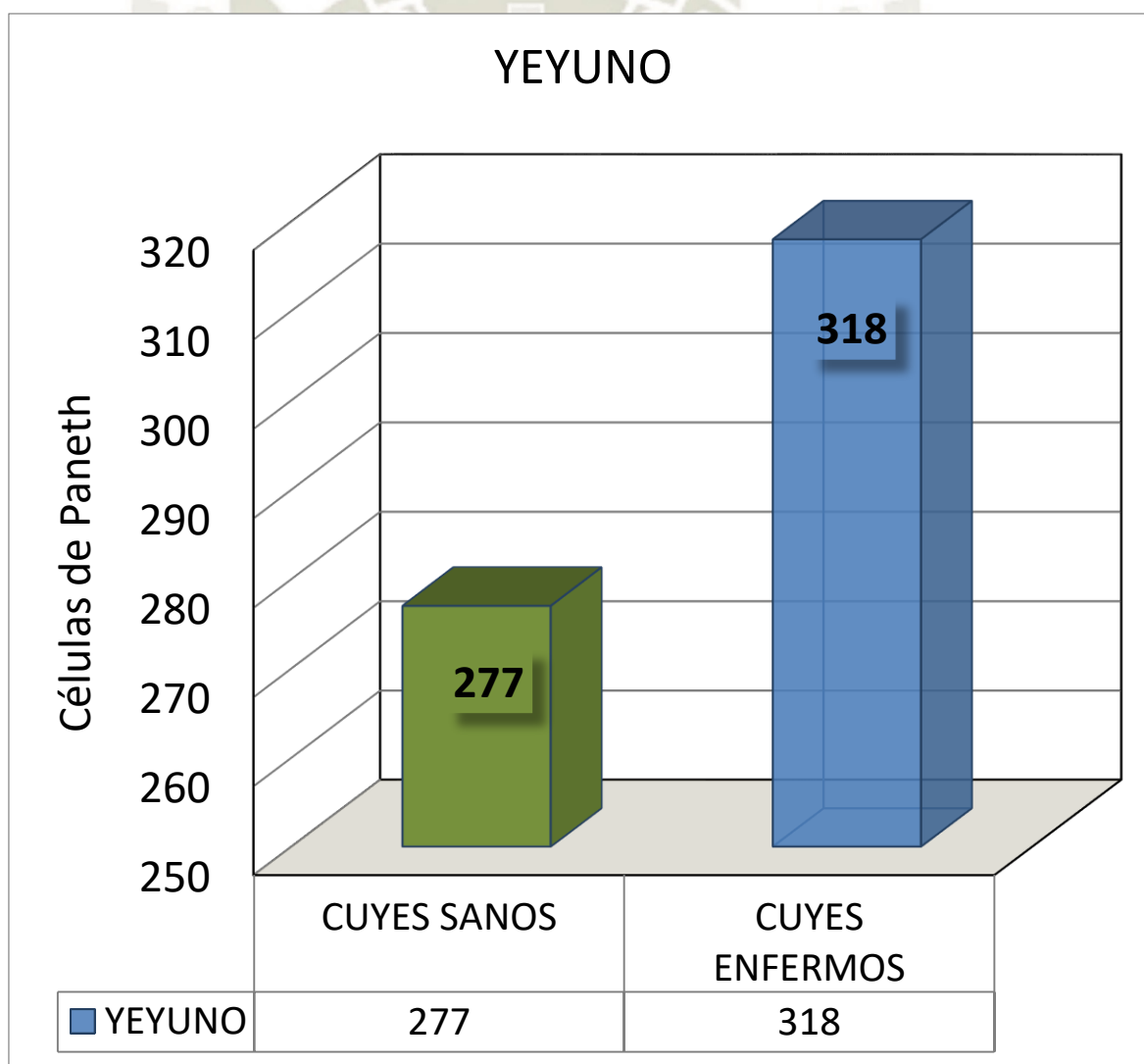
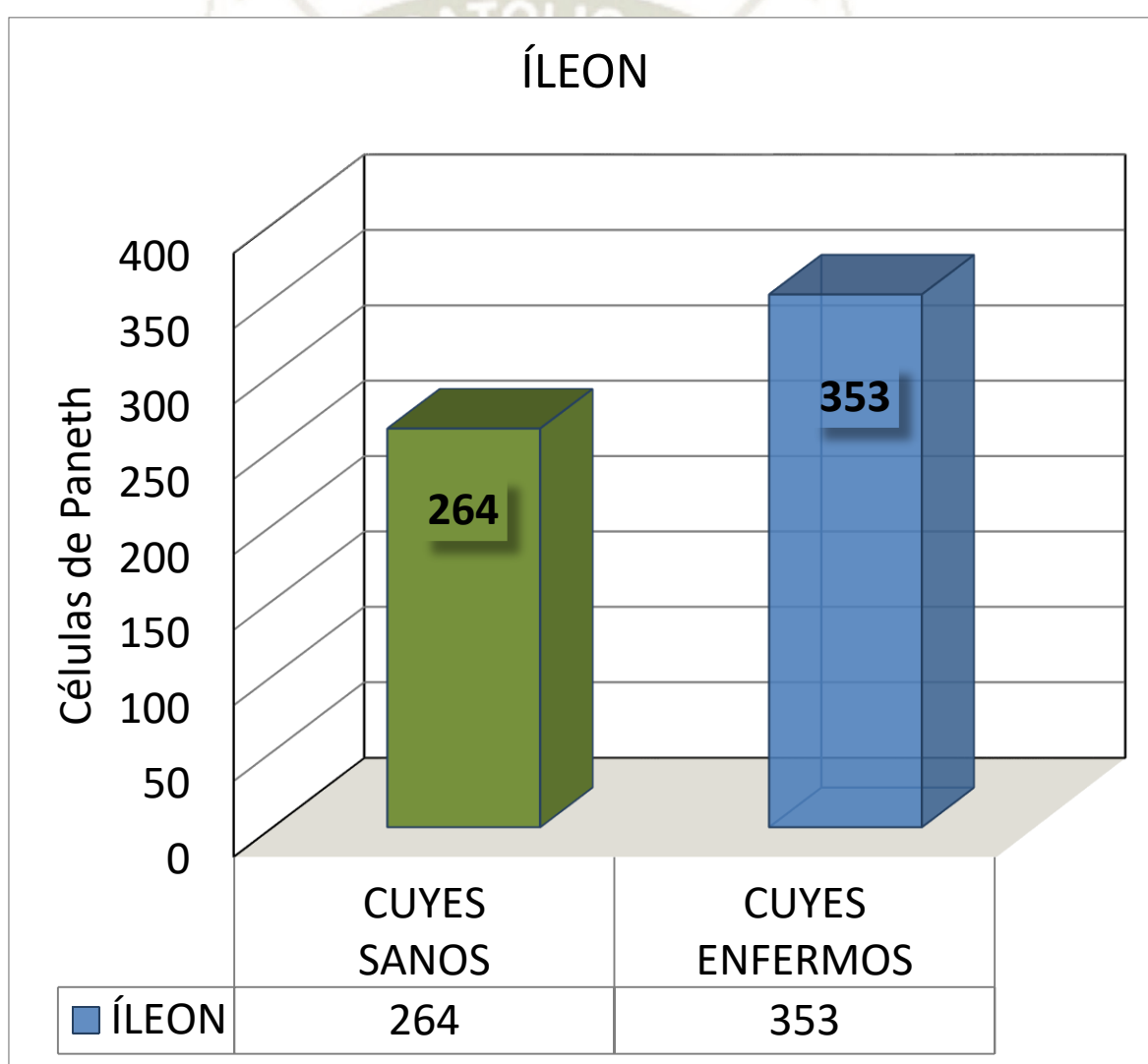


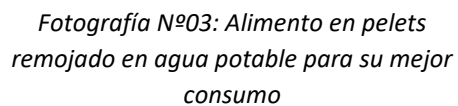
GRÁFICO N° 3

CANTIDAD Y PORCENTAJE DE CÉLULAS DE PANETH EN ÍLEON DE
CUYES SANOS Y CUYES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
Salmonella typhimurium





Fotografía N°02: Saco de Comida usado en la alimentación de cuyes



ETAPA DE INOCULACIÓN EXPERIMENTAL A LOS CUYES CON
Salmonella Typhimurium



*Fotografía N°04: Inoculación vía oral de
Salmonella Typhimurium*



*Fotografía N°05: Inoculación vía oral de Salmonella
Typhimurium*



*Fotografía N°06: Inoculación vía oral de
Salmonella Typhimurium*

ETAPA DE NECROPSIA A CUYES SANOS E INFECTADOS



*Fotografía N°07: Cuy listo
para la necropsia*

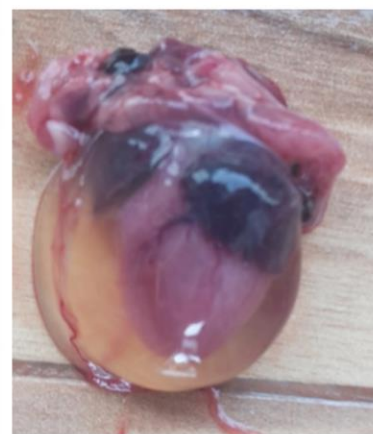
*Fotografía N°08: Cuy
con presencia de Ascitis*



*Fotografía N°09: Cuy con
Hepatitis necrótica*



*Fotografía N° 10:
Hidropericardio en cuy*



*Fotografía N°11: Cuy con
Neumonía*

*Fotografía N°12: Cuy
con Esplenomegalia*



*Fotografía N°13: Intestinos
Congestionados en cuy*



*Fotografía N°14: Intestinos
Congestionados en cuy*

TOMA DE MUESTRAS



*Fotografía N°15:
Insertando el formol en los
intestinos*

*Fotografía N°16: Muestra
debidamente rotulada*



*Fotografía N°17: Intestinos
contenidos con Formol al 10%*

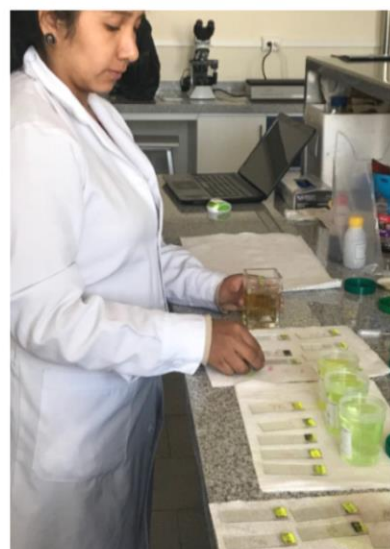


*Fotografía N°18: Muestras
debidamente rotuladas*

FOTOS TINCIÓN DE LENDRUM



*Fotografías N°19 -20: Coloración
de láminas con tinción de
Lendrum*



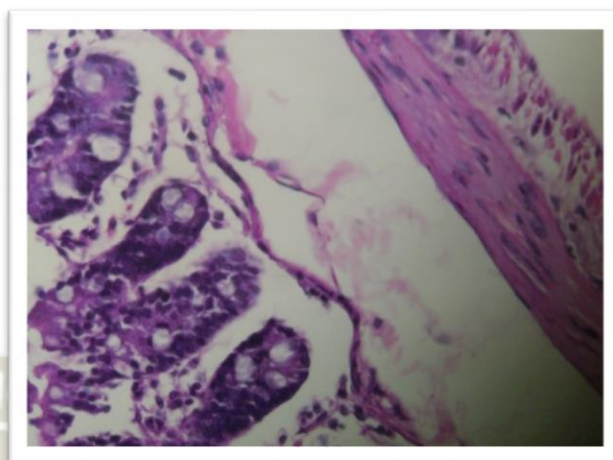
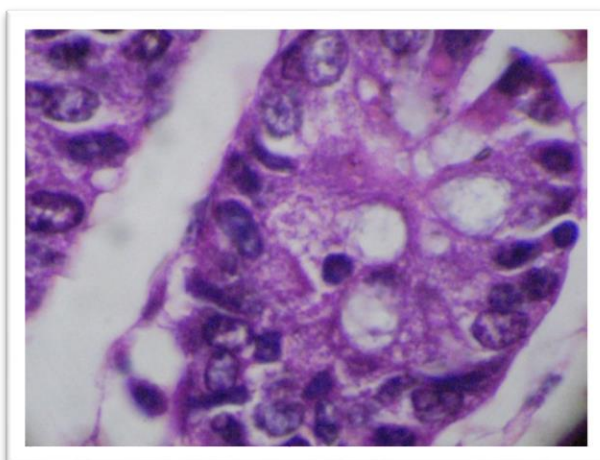
*Fotografía N°21-22: Limpieza de
Láminas*

*Fotografía N°23-24: Realizando el
montaje
con
Balsamo de Canada*

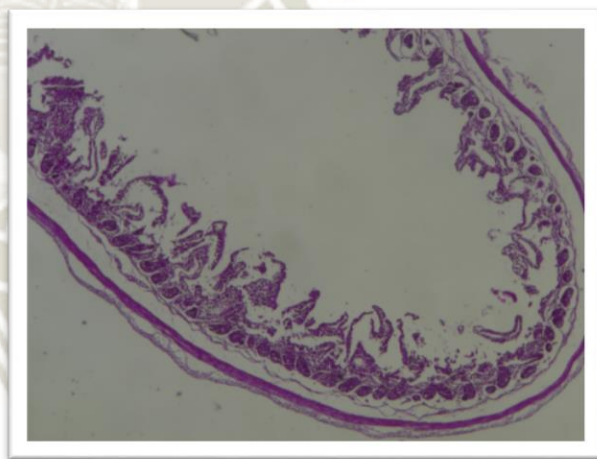
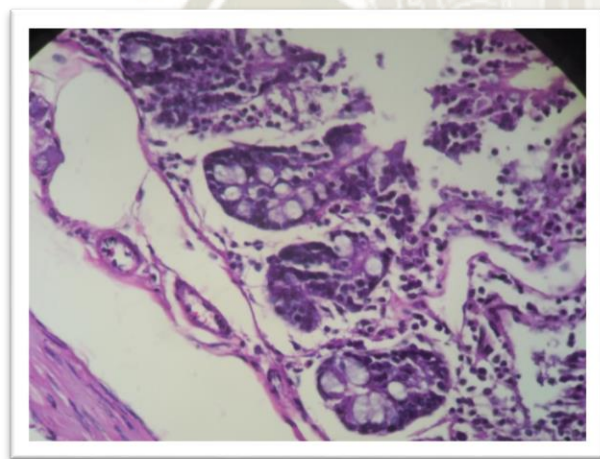


*Fotografías N°22-23:
Montaje de láminas con
bálsamo de Canadá.*

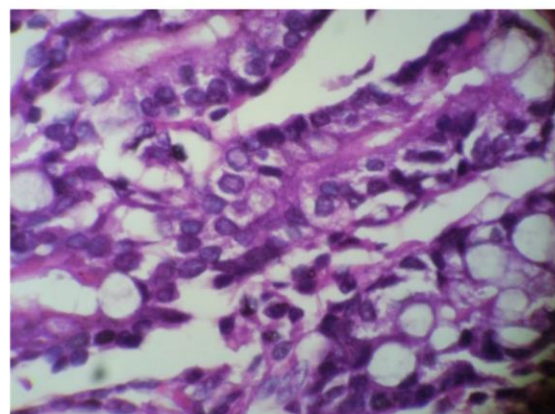
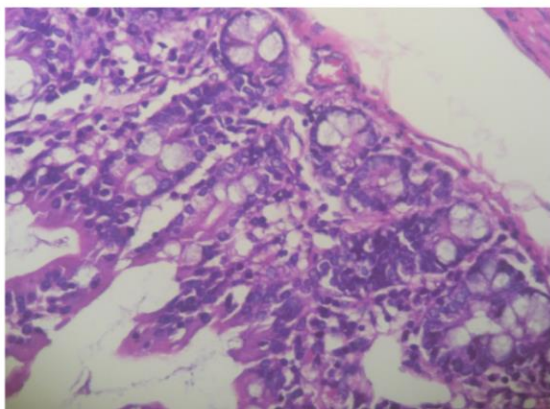
LÁMINAS AL MICROSCOPIO CON OBJETIVO DE 10X- 40X TINCIÓN
HEMATOXILINA- EOSINA



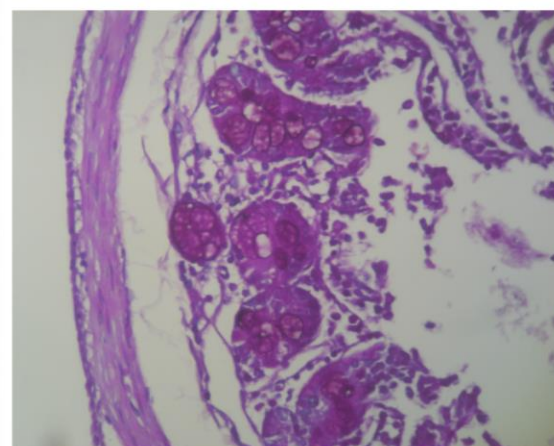
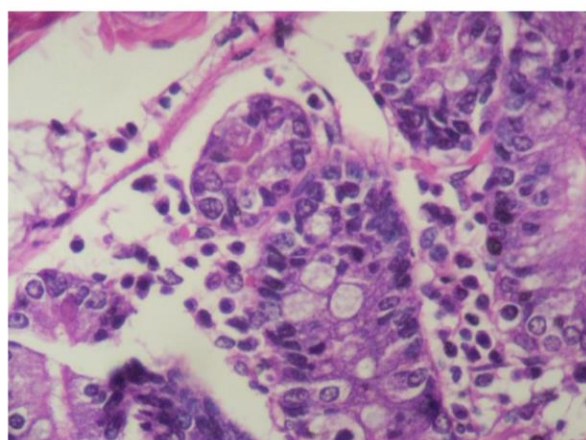
*Fotografías N°25-26: Células de
Paneth- Tinción H-E*



*Fotografías N°27-28: Células
de Paneth- Tinción H-E*

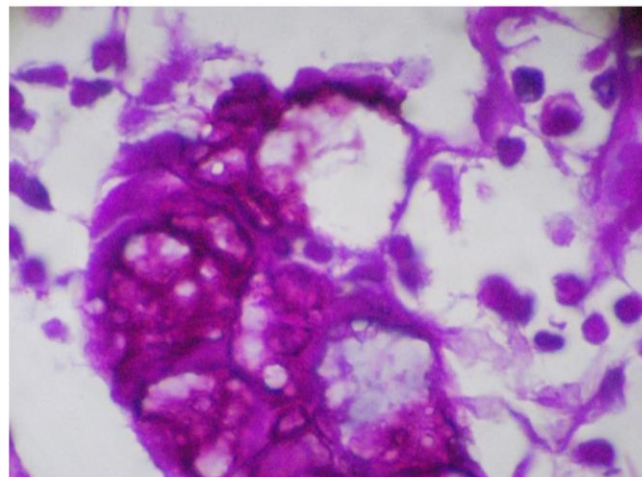
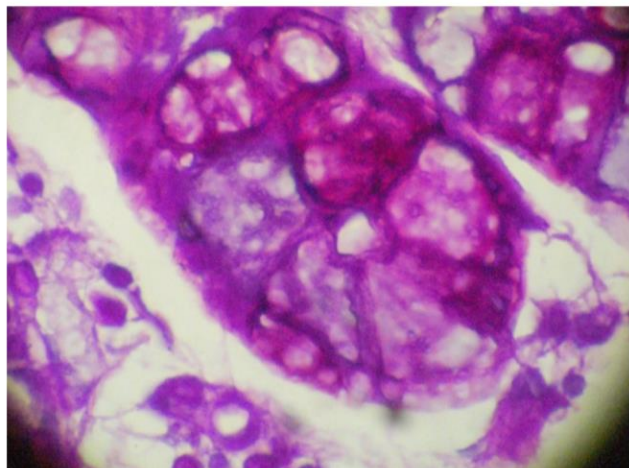


*Fotografías N°29-30: Células de
Paneth- Tinción H-E*

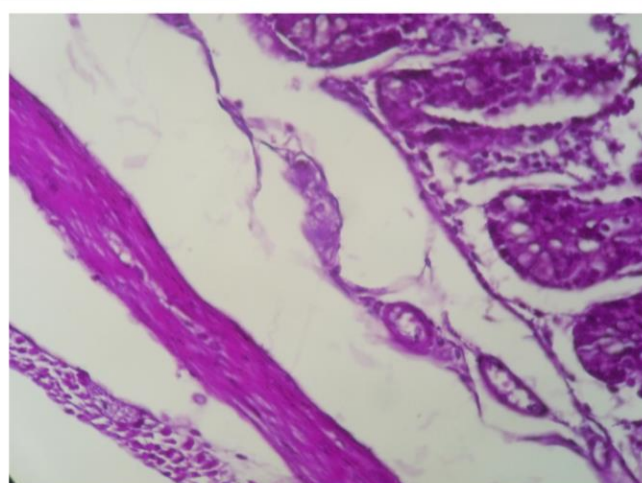
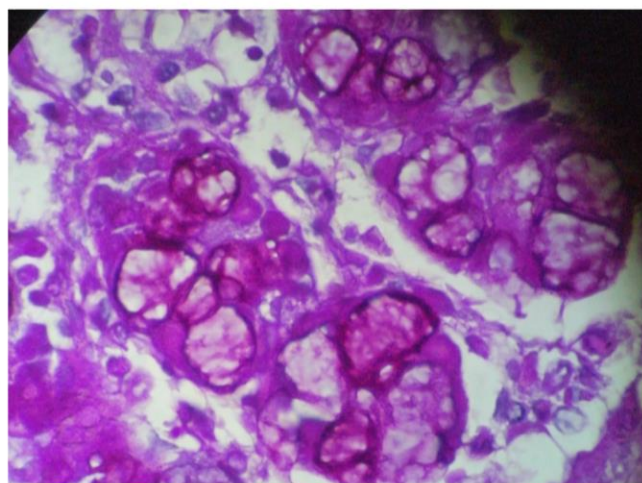


*Fotografías N°31-32: Células de
Paneth- Tinción H-E*

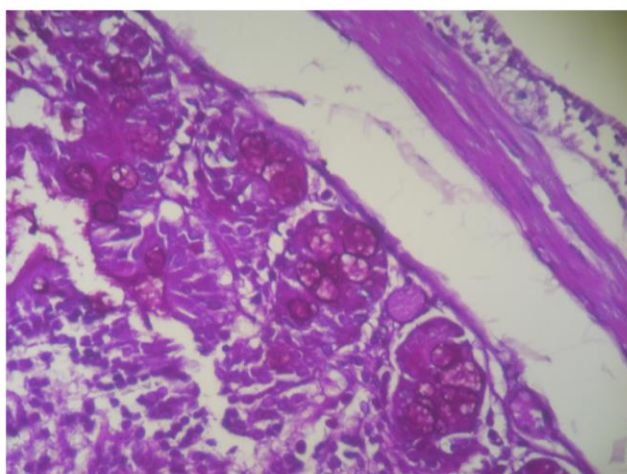
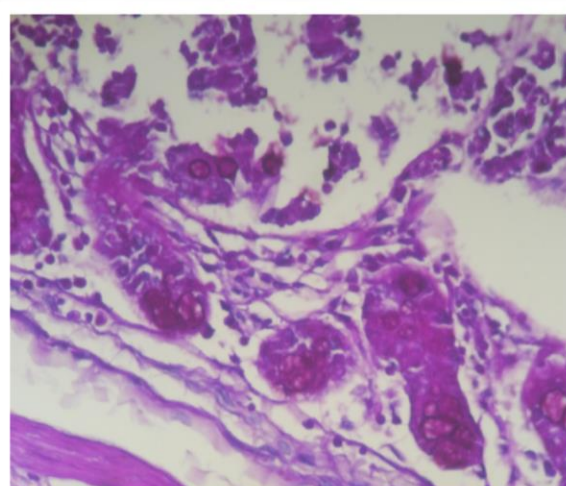
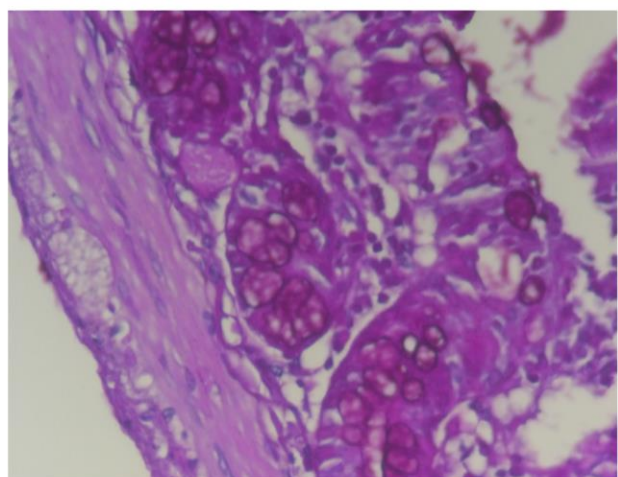
LÁMINAS AL MICROSCOPIO CON OBJETIVO DE 10X- 40X TINCIÓN PAS



*Fotografías N°33-34: Células de
Paneth- Tinción PAS*



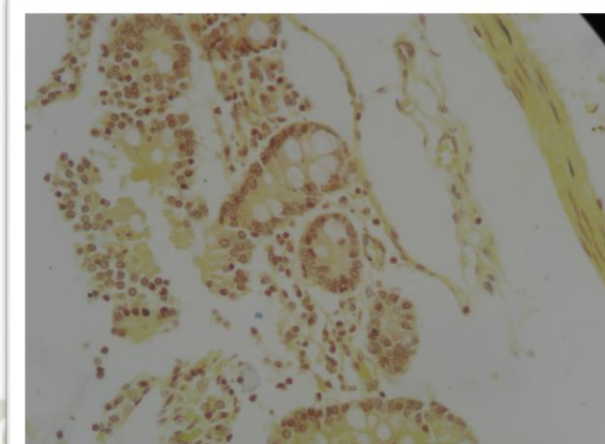
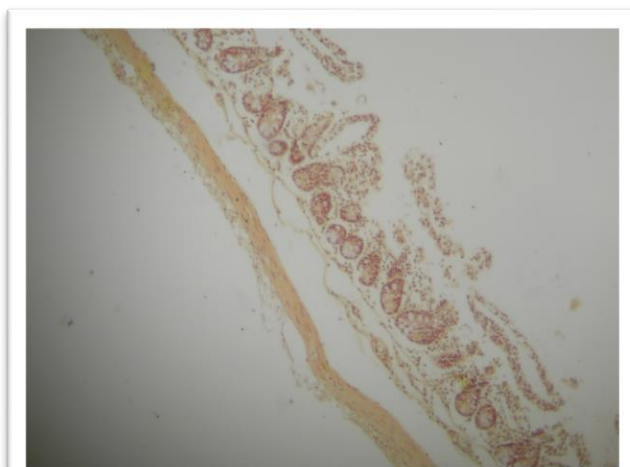
*Fotografías N°35-36: Células de Paneth-
Tinción PAS*



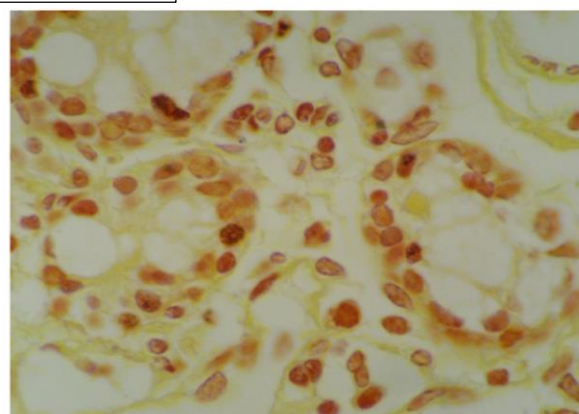
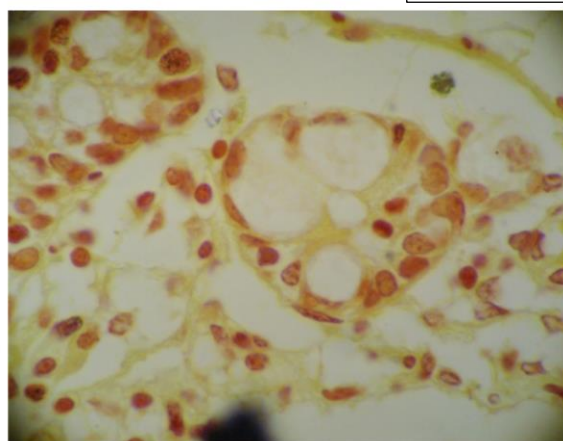
*Fotografías N°37-38-39: Células de Paneth-
Tinción PAS*

LÁMINAS AL MICROSCOPIO CON OBJETIVO DE 10X- -100X TINCIÓN

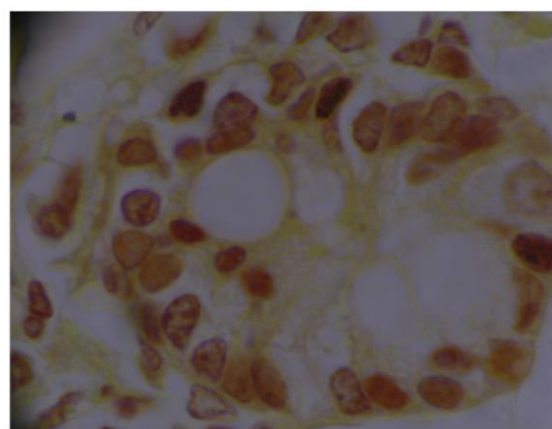
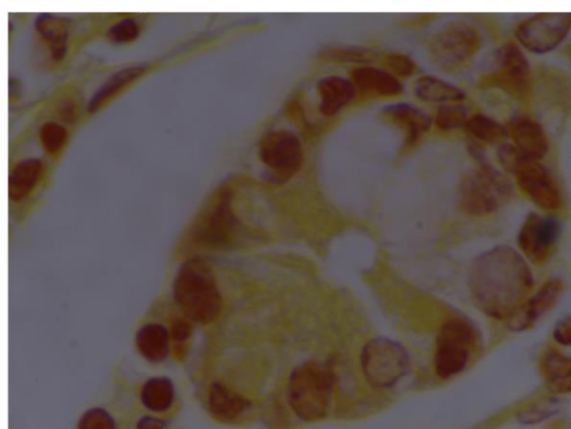
LENDRUM



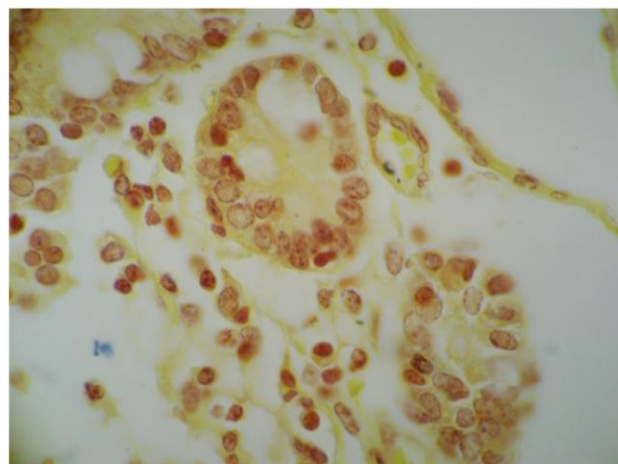
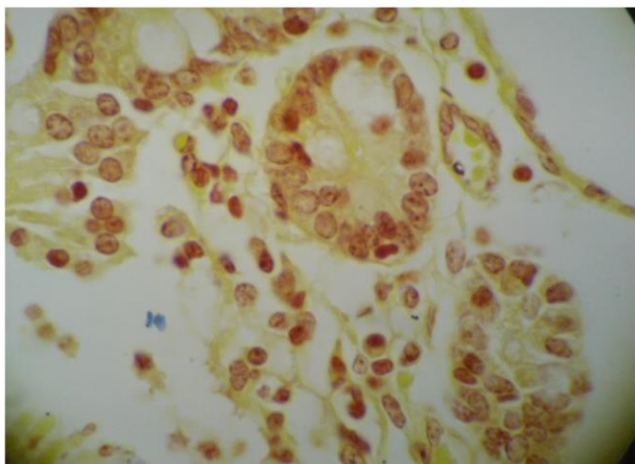
*Fotografías N°40-41: Células de
Paneth- Tinción Lendrum*



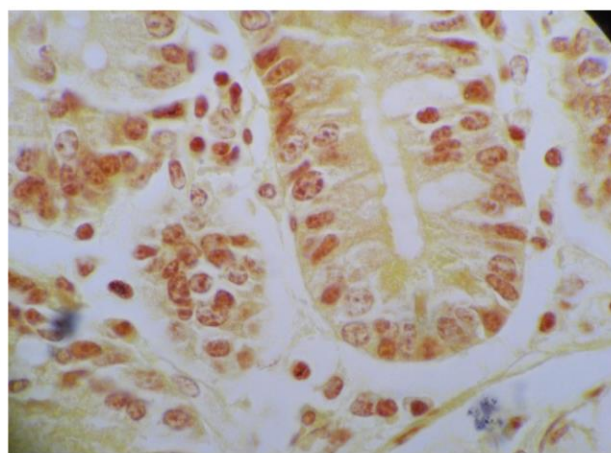
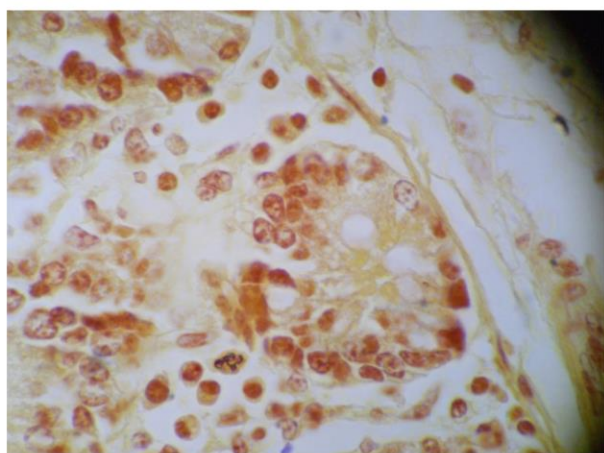
*Fotografías N°42-43: Células de
Paneth- Tinción Lendrum*



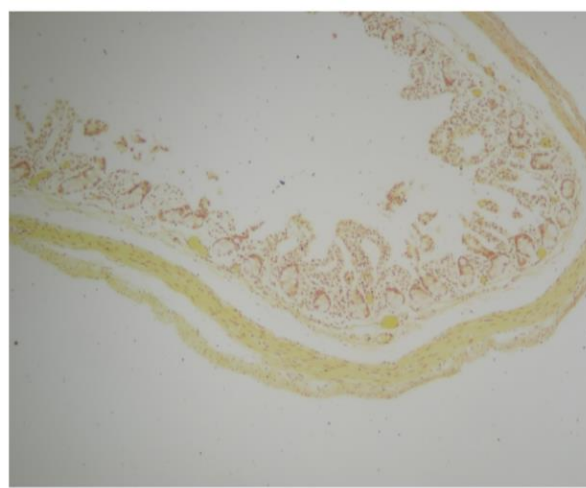
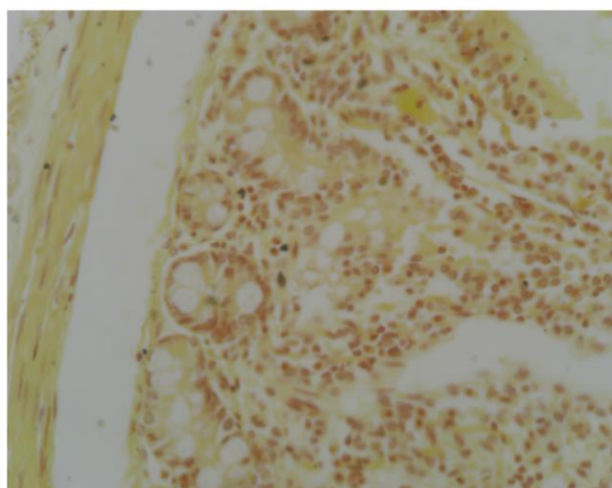
*Fotografías N°44-45: Células de
Paneth- Tinción Lendrum*



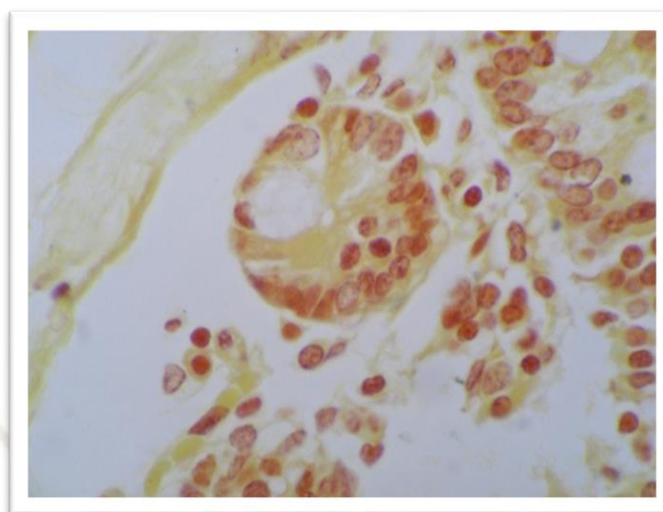
Fotografías N°46-47: Células de Paneth- Tinción Lendrum



Fotografías N°48-49: Células de Paneth- Tinción Lendrum



Fotografías N°59-51: Células de Paneth- Tinción Lendrum



*Fotografía N°52: Células de Paneth-
Tinción Lendrum*