

55

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**SOBREVIVENCIA DE *Salmonella gallinarum* U2
EN HETEROFILOS DE SANGRE PERIFERICA
DE POLLO.**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTADA POR:

DANIEL ORTEGA ALVAREZ

ASESORES: DR. GARY GARCIA ESPINOSA
DR. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

MEXICO, D. F.

2001





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
PRESIDENTE

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
VOCAL

MVZ MC NESTOR LEDESMA MARTÍNEZ
SECRETARIO

DR. GARY GARCÍA ESPINOSA
SUPLENTE

MVZ MC VICTOR MANUEL PETRONE GARCÍA
SUPLENTE

DEDICATORIAS

A TI PADRE CELESTIAL POR SALVARME Y REGALARME LA VIDA ETERNA, POR ENSEÑARME A AMAR MI VIDA, POR MOSTRARME LO PEQUEÑO QUE SOY, PORQUE ASÍ CONTEMPLA LO GRANDE QUE TÚ ERES.

GRACIAS

A MI PAPÁ MANUEL FEDERICO ORTEGA ALVAREZ PORQUE A TRAVÉS DE TU VIDA CONOCÍ LA NUEVA VIDA EN CRISTO

GRACIAS

A MI MAMÁ LUZ MARÍA ALVAREZ RIVERA POR TU AMOR, CUIDADO Y ORACIONES

¡BIENAVENTURADA!

A MIS HERMANOS MANUEL CARLOS, MOISES, DAVID Y LUZ MARÍA POR TODO SU AMOR, APOYO, CONSEJOS, Y ORACIONES

¡LOS AMO!

**AGRADECIMIENTOS AL FINANCIAMIENTO DEL LABORATORIO DE
INVESTIGACIÓN DEL DR.**

GARY GARCÍA ESPINOSA

AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO DE MATERIAL BIOLÓGICO

INVESTIGACIÓN APLICADA S.A. DE C.V.

AGRADECIMIENTOS

AL PROGRAMA DE INICIACIÓN TEMPRANA A LA INVESTIGACIÓN Y A LA DOCENCIA, POR LA BECA OTORGADA.

AL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT), CON NÚMERO IN207797 (1998-1999). POR LA BECA OTORGADA.

AL PROGRAMA DE BECAS PARA TESIS DE LICENCIATURA PROBETEL POR LA BECA OTORGADA.

AL DR GUILLERMO TELLÉZ ISAÍAS

POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE INGRESAR AL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL: AVES, POR SU ASESORIA, POR TODO SU APOYO.

AL DR GARY GARCIA ESPINOSA

POR HABERME OFRECIDO EL TEMA DE TESIS, POR LA DIRECCIÓN Y ASESORIA EN LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

A MI JURADO: Francisco Suárez Güemes, Antonio Verdugo Rodríguez, Nestor Ledesma Martínez, Víctor Manuel Petrone García

A LOS DOCTORES: Carlos López Coello, José Antonio Quintana, Juan Carlos Valladares, Miguel Ángel Ceniceros, Alejandro Banda, Reynaldo Moreno, Tamas Fehervari, Marco Antonio Juárez, Rubén Merino, Ezequiel Sánchez, Gerardo Nava, Julio Alfaro, María Teresa Casaubón, María Elena Rubio, Odette Urquiza, Pilar Castañeda, Magdalena Escorcía, Xochitl Hernández, Cecilia Rosario, Mereya Ortiz, Felipa Galindo.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL DPA: AVES POR SU APOYO TÉCNICO

Lilia Castellanos, Donaji García, Nestor Ledesma, Rodrigo Merino, Juan Merino, Adelfo Juárez

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE LA FACULTAD

Ina, Angélica, Irlanda, Leticia, Lirio, Blanca Estela, Elsa, Claudia, Heydeé, Estrella, Liliانا, Lucero, Antonio, Hugo, Alvaro, Guillermo Z, Felipe, Cesar Miguel, Francisco Daniel, Marco Antonio, Juan José, Víctor P, Daniel Martínez, Alain, Dieter, Alejandro.

A MIS PROFESORES DE LA FACULTAD

Pablo Rangel, Marcela Figueroa, José Ángel Gutiérrez, Ángel Retana, Carlos Esquivel, Dulce María B, Francisco Monroy, María Elena Trujillo, Alejandro Banda, Raymundo Martínez, Ramiro Calderón, Ángel López, Eduardo Posadas.

A MIS AMIGOS CRISTIANOS POR SUS ORACIONES

Sandra Muñoz, Haydeé Cuevas, Guadalupe Campos, Claudia Yedra, Rocío Benitez, Yessica García, Marisa Orozco, Amada Rivas, Paz Rangel, Irma Pacheco, Olimpa Saldaña, Gloria, Sandra Amarillas, Cristina González, Gaspar Campos, Marco Antonio González, Miguel Ángel Olvera, Alberto Amarillas, Alejandro Rosas, Alejandro Rosales, Fernando Curet, Andrés y Kukis, Jaime Rangel Jr, Horacio Vargas Jr., Javier Hernández, Eduardo Ramírez, Mario Díaz y familia, José Luis Segura y familia, Familia Batista, Familia Canales, Familia Muñoz, Familia Labarrere, Familia Moret, Familia Vilardell, Familia Reyes, Familia Lujano, Familia García.

RESUMEN

Ortega Alvarez Daniel. SOBREVIVENCIA DE *Salmonella gallinarum* U2 EN HETERÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE POLLO. Bajo la asesoría de: Dr Gary García Espinosa, Dr. Guillermo Téllez Isaías.

Salmonella spp. es una bacteria intracelular facultativa que tiene la habilidad de sobrevivir y multiplicarse en los compartimentos de macrófagos y neutrófilos de los mamíferos. Sin embargo, el papel central del heterófilo ante la infección por *Salmonella gallinarum* no ha sido completamente estudiado, por lo que en este trabajo se estudió si el heterófilo es una célula huésped para *Salmonella gallinarum*, como se ha descrito en las Salmonelas que infectan a los mamíferos. Para determinar la participación del heterófilo, en este estudio se aislaron heterófilos obtenidos de sangre periférica de pollo Leghorn, se infectaron con una cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* y se evaluó la capacidad fagocítica, así como la sobrevivencia y la multiplicación intracelular. Los estudios revelaron que la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* U2 es capaz de sobrevivir de manera intracelular hasta por un periodo de 4 h, pero no de multiplicarse después de ser fagocitada. En los ensayos de fagocitosis se observa mayor fagocitosis en la relación célula:bacteria 1:100, en comparación con las relaciones 1:10, 1:20, 1:50, sin embargo en la relación 1:200 existe menor número de bacterias, aun por debajo de la relación 1:10, sugiriendo que posiblemente a ésta concentración bacteriana *Salmonella gallinarum* produzca un efecto de tóxico en los heterófilos. Estos resultados indican que el heterófilo puede ser utilizado como una célula huésped para *Salmonella gallinarum*.

Palabras claves: Sobrevivencia intracelular, *Salmonella gallinarum*, heterófilos, pollos Leghorn.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
Jurado	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Resumen	VI
Lista de contenidos	VII
Lista de cuadros y figuras	IX
Lista de abreviaturas	X
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1 1	1
1.2	2
1 2 1	3
1 2 2	7
1 2 3	7
1 2 4	7
1 2 5	8
1 3	9
1 3 1	9
1 3 2	10
1 3 3	12
1 3 4	12
1 3 5	12
1 3 6	13
1 3 6.1	13
1.3 6 1.1	13
1 3 6 1 2	14
de nitrógeno	14
1 3 6 2	14
1 3 6 3	16
Interacción entre mecanismos dependientes e independientes de oxígeno	16
1 3 7	16
Mecanismos microbicidas descritos en heterófilos	16
1 4	18
1 5	18
1 6	18

	1.6.1	Objetivo general	18
	1.6.2	Objetivo particular	19
2.0	MATERIAL Y MÉTODOS		19
	2.1	Animales	19
	2.2	Aislamiento de heterófilos a partir de sangre periférica	19
	2.3	Preparación de la bacteria	20
	2.4.1	Capacidad fagocítica de los heterófilos provenientes de sangre periférica	20
	2.5	Sobrevivencia de <i>Salmonella gallinarum</i> dentro de los heterófilos	21
3.0	RESULTADOS		22
	3.1	Capacidad fagocítica de los heterófilos	22
	3.2	Sobrevivencia de <i>S. gallinarum</i> dentro de los heterófilos	22
4.0	DISCUSIÓN		23
5.0	CONCLUSIONES		26
6.0	LITERATURA CITADA		26

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página	
Cuadro 1	Factores de virulencia descritos en <i>S. gallinarum</i>	2
Cuadro 2.	Receptores que promueven la fagocitosis en células de mamífero	11
Cuadro 3.	Proteínas presentes en los gránulos de los neutrófilos	15
Cuadro 4.	Proteínas presentes en los gránulos de los heterófilos	17
Figura 1.	Algunos determinantes genéticos de virulencia de <i>S. typhimurium</i>	4
Figura 2.	Los sistemas sensor y regulador de <i>S. typhimurium</i>	6
Figura 3.	Capacidad de los heterófilos de pollo Leghorn para fagocitar la cepa silvestre de <i>S. gallinarum</i> U2	22
Figura 4.	Sobrevivencia intracelular de la cepa silvestre de <i>S. gallinarum</i> U2 en los heterófilos de pollo Leghorn	23

LISTA DE ABREVIATURAS

BPI	Proteína que incrementa la permeabilidad bacteriana
CR	Receptor del complemento
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbeccos
EAF	Epitelio asociado a folículo
EPEC	<i>Escherchia coli</i> enteropatógena
Fc	Fragmento cristizable
HBSS	Solución salina amortiguadora de Hanks'
Ig	Inmunoglobulina
IP	Isla de patogenicidad
IPS	Isla de patogenicidad de <i>S. typhimurium</i>
IRN	Intermediarios reactivos de nitrógeno
IRO	Intermediarios reactivos de oxígeno
Kb	Kilo base
LPS	Lipopolisacárido
MPO	Mieloperoxidasa
nm	Nanómetros
NOs	Óxido nítrico sintasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
R	Receptor
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA	Agar de soya tripticasina
TSB	Caldo de soya tripticasina
UFC	Unidades formadoras de colonias

1.0 INTRODUCCIÓN

Salmonella spp. es una bacteria intracelular facultativa capaz de causar enfermedad en una gran variedad de especies animales, incluyendo los seres humanos¹. Algunos serotipos de *Salmonella* están adaptados a un huésped específico (p.e., *S. typhi* puede infectar a los seres humanos, *S. gallinarum* y *S. pullorum* a la mayoría de las aves). En contraste, otros serotipos pueden infectar a una amplia variedad de huéspedes (p.e., *S. enteritidis*). Las bases moleculares por la que algunos serotipos específicos están adaptados a un sólo huésped, son comprendidas escasamente. Una característica común de la patogénesis de todas las Salmonelas es su habilidad para acceder en las células que normalmente no son fagocíticas, como las células del epitelio intestinal, que son la puerta de entrada de este microorganismo, así como en los neutrófilos que constituyen un "sitio seguro" para el periodo posterior del ciclo patogénico de las Salmonelas^{2, 3, 4, 5, 6}.

1.1 Características de la infección por *Salmonella gallinarum* en los pollos

Salmonella gallinarum, es el agente etiológico de la tifoidea aviar en pollos⁷, enfermedad sistémica que involucra principalmente al sistema fagocitario mononuclear⁸. *Salmonella gallinarum* es capaz de producir enfermedad principalmente a los pollitos recién nacidos hasta sus primeros 7 días de edad, posteriormente los pollitos adquieren una resistencia natural de la enfermedad incluso a dosis de 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por la vía natural^{9, 10}. Sin embargo, algunas líneas de pollos pueden enfermar e incluso hasta morir en su edad joven o adulta con dosis de 10^4 UFC¹¹. El curso de la infección puede ser agudo o crónico. La mortalidad asociada con la enfermedad es frecuentemente alta, en condiciones experimentales con pollos recién nacidos puede ser del 100%⁹. Diversos investigadores han descrito los factores de virulencia presentes en *Salmonella gallinarum* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores de virulencia descritos en *S. gallinarum*

Factor	Referencia
Plásmido de alto peso molecular (85 kb)	Barrow PA, <i>et al.</i> , 1987
Gene de la proteína reguladora del plásmido (spvR) de 85 kb	Pascopella L y Small PLC (datos no publicados)
Genes del plásmido de virulencia de la subunidad estructural menor de la fimbria FaeH y FaeI	Rychlik I, <i>et al.</i> , 1998
Gene de la proteína de invasión (invA) IPS-1	Boyd EF, <i>et al.</i> , 1996
Genes de las proteínas de invasión SpaO (spaO), SpaP (spaP) y SpaQ (spaQ) IPS-1	Li J, <i>et al.</i> , 1995
Genes pipA, pipB y pipD IPS-5	Wood MW <i>et al.</i> , 1998

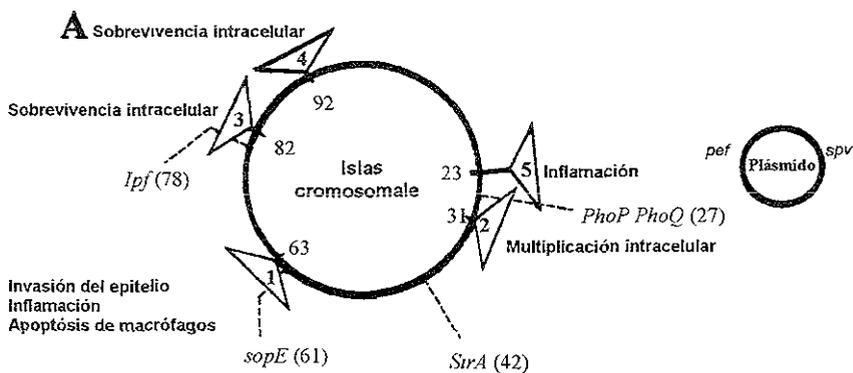
1.2 PATOGÉNESIS MOLECULAR EN LAS INFECCIONES POR *Salmonella typhimurium* Y LA RESPUESTA DEL HUÉSPED

Las especies de *Salmonella* (sobre todo *S. typhimurium*) representan organismos que pueden usarse para investigar la compleja interacción que ocurre entre un patógeno y su huésped tanto en estudios, *in vitro*, como, *in vivo*. La facilidad con que puede cultivarse *S. typhimurium* y manipularse genéticamente, así como la disponibilidad de modelos de cultivo de tejidos y modelos animales, ha hecho de *S. typhimurium* un organismo deseable para este tipo de estudios. El modelo más popular de infección de *Salmonella* es el modelo de tifoidea en murinos.

El estudio molecular en procariontes, ha facilitado la identificación de los principales factores de virulencia de *S. typhimurium* y la caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción huésped-bacteria^{17, 18, 19}.

1.2.1 Determinantes genéticos de virulencia y su regulación

La mayoría de los genes de virulencia de *S. typhimurium* están agrupados y cada grupo distinto recibe el nombre de isla de patogenicidad (IP). Las IP se encuentran también en varias enterobacterias incluyendo *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en Inglés)²⁰, entre otras. La figura 1 ilustra la distribución de las IP de *S. typhimurium* (IPS), así como otros componentes esenciales de virulencia.



B

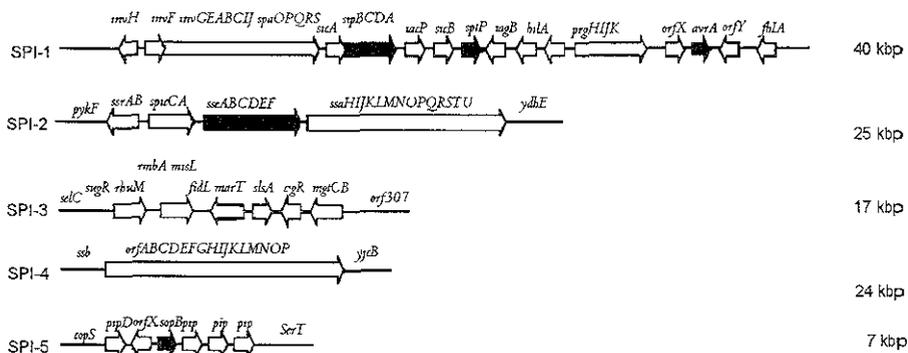


Figura 1. Algunos determinantes genéticos de virulencia de *S. typhimurium*. **A.** Distribución física de las islas de patogenicidad (triángulos) y los principales factores de virulencia. Las distancias del cromosoma bacteriano están indicadas en minutos. **B.** Organización genética de las islas de patogenicidad. Figura de Jean-Claude Sirard, Florence Niedergang, Jean-Pierre Kraehenbuhl. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccine. *Immunological Reviews* 1999,171:5-26.

Las IPS-1 y IPS -2 codifican un aparato de secreción de tipo III, que permite la inyección de proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula del huésped,

a través de un canal molecular especializado²¹ El sistema de secreción tipo III, encontrado en otras enterobacterias, es independiente de la ruta de secreción por *sec*^{18, 22, 23}. La maquinaria de IPS-1 inyecta dentro de células de mamífero proteínas efectoras, que inducen al acomodo de actina del citoesqueleto, dando como resultado, membranas onduladas e internación de *Salmonella*^{24, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30}

La IPS-1 efectora también participa en la reacción inflamatoria generada por la bacteria en la mucosa intestinal La IPS-2 consiste en genes que controlan la multiplicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de células epiteliales y fagocíticas^{31, 32, 33}. La IPS-3 es requerida para la sobrevivencia intracelular en macrófagos, debido a que provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg^{2+} ^{34, 35}. La IPS-4 codifica un sistema de secreción de tipo I mediante secreción de toxinas y puede llegar a participar en la adaptación de *Salmonella* en el ambiente intracelular de los macrófagos³⁶ Finalmente, la IPS-5 codifica factores involucrados en la secreción de fluidos y la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal ocasionados por *Salmonella dublin* e invasión ocasionada por *S. typhimurium*, como SopB (SigD), una proteína efectora secretada por la SPI-1^{16, 37}. En cuanto al papel de las proteínas codificadas por los plásmidos de *Salmonella*, éstos participan en la lisis de los macrófagos³⁸.

Los microorganismos patógenos se tienen que adaptar a los drásticos cambios ambientales al viajar a lo largo del tracto digestivo y cuando ellos pasan del ambiente extracelular al intracelular^{39, 40} Los microorganismos se preparan para modular su metabolismo produciendo factores tóxicos El metabolismo de la bacteria es limitado durante el ciclo de infección. La maquinaria con la cual se lleva a cabo la infección es regulada por una gran variedad de señales ambientales que controlan los genes de virulencia que activan, reprimen o ambas, totalmente las propiedades del microbio⁴¹ Para llevar a cabo semejante control, *Salmonella* usa diversos sistemas de dos componentes regulatorios, los cuales incluyen al sensor histidina cinasa y al grupo regulador transcripcional (Figura 2)

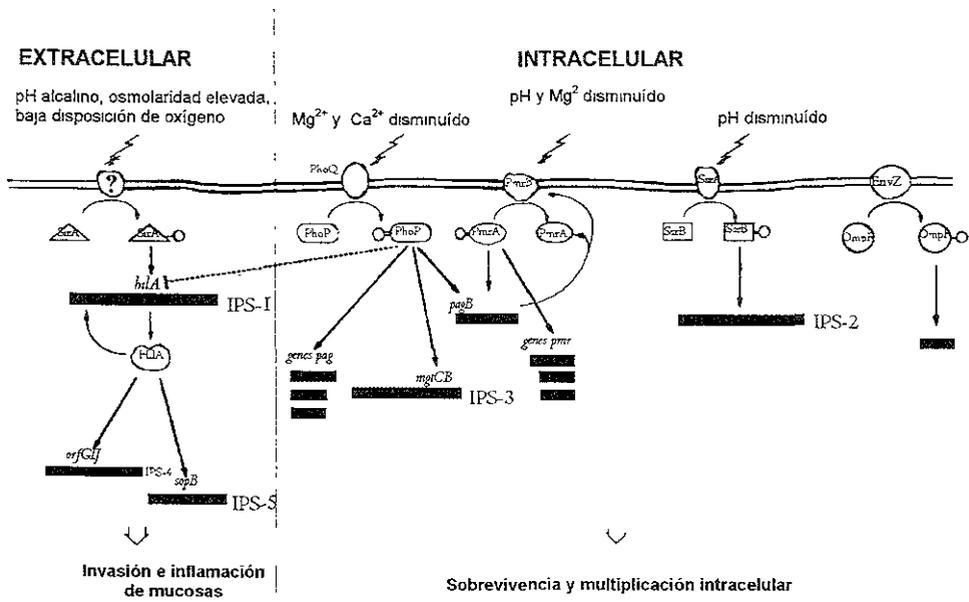


Figura 2. Los sistemas sensor y regulador de *S. typhimurium*. Las señales ambientales modulan la expresión de los factores de virulencia de *S. typhimurium*. Los sensores bacterianos, presentados como una proteína de membrana integral, reciben señales y activan al regulador transcripcional por fosforilación. La activación (flechas negras continuas) o la supresión (líneas punteadas) de la expresión del conjunto de los genes. El regulador *SirA* es encendido en el compartimento extracelular por las condiciones ambientales del lumen intestinal. En contraste, la virulencia intracelular es inducida por los factores específicos en las vacuolas fagocíticas. Figura de Jean-Claude Sirard, Florence Niedergang, Jean-Pierre Kraehenbuhl. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccine. Immunological Reviews 1999, 171 5-26.

También participan PhoQ/PhoP, el sensor SirA, PmrB/PmrA, SsrA/SsrB, y EnvZ/OmpR que le permiten a la bacteria adaptarse al ambiente hostil de los compartimentos de los fagocitos profesionales^{42, 43, 44, 45, 46}.

1.2.2 *Salmonella typhimurium* invade tejidos de mucosa

Posterior a la ingestión de alimento o agua contaminada con *Salmonella* se inicia el ciclo de infección una vez que ha pasado el ambiente del ácido gástrico. Un requisito previo a la infección es la adherencia a las vellosidades del epitelio del íleon o al epitelio asociado a foliculo (EAF) sobre las placas de Peyer. Se ha observado que en ratones y terneros, *S. typhimurium* es capaz de adherirse a las vellosidades de células de absorción, pero teniendo preferencia para adherirse en células M del EAF^{47, 2, 48, 49, 50}. Debido a la ausencia de vellosidades apicales y el glicocalix asociado, las células M aunque expresan actividad de transcitosos, representan la puerta de entrada ideal para bacterias enteropatógenicas^{51,52}.

1.2.3 *Salmonella typhimurium* invade células fagocíticas

Los macrófagos han sido considerados la principal célula blanco encontrada por la bacteria, desde que ésta atraviesa la barrera epitelial. Se ha observado que *S. typhimurium* es transportada entre las vellosidades de los enterocitos del íleon, usando como modelo de estudio íleon ligado proveniente de terneros y es liberada dentro de la lámina propia donde es tomada por un macrófago⁴⁷. Las células dendríticas presentes en las vellosidades, también pueden jugar este papel. Los macrófagos residentes constituyen una línea de defensa para prevenir el progreso de infecciones por *Salmonella*, pero esto también puede representar un reservorio, en el cual la bacteria se esconde y escapa del sistema inmune. En las placas de Peyer, los macrófagos están ausentes en el área domo sobre los folículos. En esta región hay presencia de EAF, células M, células dendríticas, linfocitos B, así como expresión de la integrina específica CD18/CD11c^{53, 54}.

1.2.4 *Salmonella typhimurium* es transportada por macrófagos

Salmonella, lejos de ser destruida por macrófagos, es capaz de sobrevivir en éstas células⁵⁵. El bloqueo de la fusión del lisosoma con el fagosoma, para

evitar los mecanismos con actividad bactericida independiente de O₂ y N, es un evento que se ha sugerido por algunos investigadores^{56,57}, aunque existe evidencia opuesta a ello^{58,59}. Lo cierto es que a pesar de que el lisosoma lograra fusionarse, la bacteria es capaz de utilizar mecanismos alternativos de defensa contra el contenido enzimático del lisosoma. Uno de estos mecanismos es la acilación del LPS de la membrana externa de la *Salmonella*, regulada por PhoQ/PhoP, que evita el anclaje de los péptidos catiónicos antimicrobianos y por lo tanto el bloqueo de la formación de poros en su membrana⁶⁰.

Para sobrevivir en macrófagos, *S. typhimurium* toma ventaja de un grupo de genes regulados por el sistema regulador PhoQ/phoP, incluyendo los genes activados PhoP (*pag*); el PmrA/PmrB sistema de dos componentes que controlan genes involucrados en la resistencia de péptidos catiónicos, y genes que codifican transporte de magnesio (SPI-3). La inactivación de la señal de genes *pag* no tiene efecto en la virulencia, reflejando un alto grado de redundancia como es observado en los genes de invasión⁶¹. Estos datos sugieren que *Salmonella* se adapta óptimamente para sobrevivir tanto en huéspedes diferentes y células fagocíticas incluyendo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.

1.2.5 Diseminación

Posterior a la infección de los tejidos de mucosas, *S. typhimurium* alcanza subsecuentemente el bazo y el hígado donde puede multiplicarse inicialmente dentro de neutrófilos y macrófagos, posteriormente sólo dentro de los macrófagos⁶². Se ha propuesto que la bacteria alcanza los distintos órganos dentro de macrófagos. No hay evidencias experimentales que indiquen que el macrófago pueda viajar de sitios de mucosas para filtrarse en nodos linfoides entrar a la circulación y migrar por el bazo. En la diseminación sistémica participan las células fagocíticas, los plásmidos de virulencia y la región de la SPI-2^{32, 33, 63, 64}.

1.3 Fagocitos profesionales polimorfonucleares

Los neutrófilos al ser una célula fagocítica profesional es uno de los componentes más importante del sistema de defensa innato del huésped, participa en la fagocitosis y lisis del microorganismo que penetra la barrera del epitelio intestinal

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) se forman a partir de un linaje mieloide en la médula ósea durante la hematopoyesis. Estos son liberados a la sangre periférica donde circulan de siete a diez horas antes de emigrar a los tejidos donde tienen una vida media de 1 a 2 días en humanos⁶⁵. Posteriormente mueren por apoptosis y sus restos celulares son removidos por macrófagos^{66, 67}.

Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de inflamación⁶⁸. El movimiento de neutrófilos en circulación hacia los tejidos, recibe el nombre de extravasación, lo cual involucra diversos pasos: Primero, la célula se adhiere al endotelio vascular⁶⁹, después penetra al espacio entre el endotelio adyacente de las células epiteliales de la pared del vaso sanguíneo⁷⁰, y, finalmente penetra en la membrana basal del tejido⁷¹.

1.3.1 Fagocitosis

La fagocitosis es la ingestión de partículas relativamente grandes ($>0.5\mu\text{m}$), llevada a cabo por las células fagocíticas profesionales. Este mecanismo es llevado a cabo en la remodelación de tejido, en la inflamación y en la defensa contra agentes infecciosos⁷². Paradójicamente, la fagocitosis es también un mecanismo común por medio del cual ciertos microorganismos invaden las células del huésped y así evaden los mecanismos de destrucción directa de los anticuerpos o el complemento.

El proceso fagocítico puede ser dividido dentro de diversos pasos: la adhesión de la partícula en la superficie celular, la formación de una vesícula endocítica llamada fagosoma, la maduración del fagosoma para convertirse en fagolisosoma, y, finalmente, la digestión dentro del fagolisosoma. El proceso es iniciado por señales, dichas señales son originadas en los receptores que participan en la adhesión de la partícula. El proceso de la fagocitosis está íntimamente relacionado con el proceso endocítico, el cual también está involucrado en la presentación de péptidos antigénicos del material fagocitado. Una de las principales funciones de la fagocitosis es la destrucción de microorganismos, sin embargo, diversos patógenos son capaces de vivir dentro del fagosoma y aún dentro del fagolisosoma⁷³.

1.3.2 Formación del fagosoma

Cuando las partículas se adhieren en la superficie celular, la membrana celular se invagina para formar el fagosoma. Este proceso es llevado a cabo por diferentes receptores (Cuadro 2) que facilitan la adhesión de las partículas en la superficie celular. Estos receptores pueden interactuar directamente con la partícula a fagocitar, a través de sus determinantes estructurales presentes en la superficie de la partícula (fagocitosis sin opsoninas), o indirectamente, por reconocimiento de opsoninas proporcionadas por el huésped (fagocitosis dependiente de opsoninas). Los receptores de opsoninas que han sido caracterizados son de la porción Fc de IgG (FcγR)⁷⁴, y el receptor del complemento 3 (CR3, por sus siglas en inglés) que fija la proteína del complemento 3b. El FcγR constitutivo permanece activo en la fagocitosis, mientras que el CR3 capta la partícula, pero no participa en la internación de la misma, sólo a través de un estímulo adicional, como lo son ésteres de forbol o estimulación de citocinas o por un enlace con proteínas de la matriz extracelular⁷⁵.

Cuadro 2.

Receptores que Promueven la Fagocitosis en Células* de Mamífero

Receptores dependientes de opsoninas

Receptores Fc (F α R, Fc ϵ R y Fc γ R) ^{M,N(74, 76 77)}

Receptores del complemento (CR1 y CR3) ^{M N(76 77)}

Receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) ^{M(76)}

Receptores independientes de opsoninas

Receptores del complemento (CR3) ^{M, N(77)}

Receptores de endotoxina (CD18, CD14) ^{M(76, 77)}

Integrinas β 1 (incluyendo receptores p/fibronectina, colágeno y laminina) ^{M(77)}

Integrinas β 3 ^{M(77)}

Receptor de manosa ^{M, N(76,77)}

Receptor β Glucano ^{M(78)}

Receptor de galactosa ^{M(79)}

Receptor carroñero/limpieza ^{M,N(77)}

*M. Macrófago N: Neutrófilo

La fagocitosis mediante FcR y CR es llevada a cabo por la reorganización de filamentos de actina (F-actina) ^{80, 81}. El receptor Fc γ R inicia la fagocitosis por un mecanismo de cremallera, interactuando una IgG opsonizada con Fc γ R, estimulando la extensión de pseudópodos alrededor de la partícula para producir un fagosoma, acercando estrechamente a la partícula ^{82, 83, 84}. Sin embargo, las partículas que son adheridas a CR se hunden directamente en el cuerpo de la célula para formar un pequeño pseudópodo. Por lo tanto, la membrana del fagosoma se une herméticamente a las partículas opsonizadas con el complemento, como áreas de contacto que separan regiones más sueltas de la membrana (Kaplan G, 1977, Allen LAH y Aderem A, 1996 ^{83, 84}).

1.3.3 El destino intracelular del fagosoma

La formación del fagosoma es llevada a cabo a través de una serie de procesos de fusión/fisión con vesículas presentes en la célula, principalmente con los organelos de la ruta endocítica y eventualmente con el fagolisosoma. Así, los cambios graduales de la membrana del fagosoma llegan a ser más similares que los endosomas tardíos y lisosomas en la ruta endocítica⁸⁵.

1.3.4 Degradación de las partículas fagocitadas

Las partículas fagocitadas probablemente son degradadas por la misma maquinaria utilizada en el material internado por el proceso endocítico, y la acidificación del fagosoma es un componente crítico en el proceso de degradación como lo es en la ruta endocítica. La acumulación de ATPasas en la membrana fagosomal permite la maduración⁸⁶ y puede estar involucrado en la acidificación del fagosoma. La partícula puede ser completamente degradada dentro del compartimento fagolisosomal, o ocurrir una degradación parcial en el fagosoma con un subsecuente transporte al endosoma tardío para una proteólisis completa⁸⁷.

1.3.5 Mecanismos que evaden la defensa del huésped

Diferentes patógenos pueden interferir en uno o más de los diferentes pasos en el proceso fagocítico para sobrevivir dentro de la célula huésped. Como se mencionó anteriormente, la principal función de la fagocitosis es la ingestión y eliminación de agentes infecciosos, y la mayoría de las bacterias, incluyendo muchos patógenos bacterianos, que son fagocitados por macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares son eliminados. Sin embargo, diversos patógenos han desarrollado varias estrategias para sobrevivir y multiplicarse dentro de las células. Para efectos de este tema de tesis sólo se menciona la sobrevivencia de *Salmonella typhimurium* dentro del fagolisosoma (Ver ***Salmonella typhimurium* es transportada por macrófagos** página 7 y **Diseminación** página 8)

1.3.6 Mecanismos microbicidas en neutrófilos

Los mecanismos microbicidas consisten en una combinación de procesos oxidativos y enzimáticos (independientes de oxígeno), que se activan simultáneamente al iniciar la fagocitosis. Subsecuente a la fagocitosis son activados dos procesos microbicidas: (i) el estallido respiratorio, llamado así por un incremento 50 a 100 veces más en el consumo de O_2 , dando como resultado la producción directa de metabolitos intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) e indirectamente metabolitos intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN); (ii) la degranulación, que corresponde a la liberación de contenidos de gránulos azurofílicos (primarios) y específicos (secundarios), dentro del fagosoma para formar el fagolisosoma⁸⁸.

1.3.6.1 Mecanismos oxidativos

1.3.6.1.1 Metabolitos intermediarios reactivos de oxígeno. El estallido respiratorio u oxidativo en neutrófilos, es desencadenado en la fagocitosis o cuando la ruta es activada, *in vitro*, por un estímulo sintético apropiado. El estallido respiratorio da como resultado la producción secuencial de una variedad de metabolitos intermediarios reactivos de oxígeno IRO bacterioestáticos y bactericidas. El superóxido (O_2^-) es formado, inicialmente, por la reducción de oxígeno molecular por electrones simples que son originados de NADPH, generados vía segmentos oxidativos de la vía pentosa fosfato. Este proceso es catalizado por la acción combinada de la NADPH oxidasa en la membrana plasmática y el citocromo b_{558} ⁸⁹. Sin bien O_2^- puede contribuir a la muerte microbiana, otros IOR más potentes, son generados rápidamente de este precursor. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es formado por dismutación espontánea, acción catalítica de superóxido dismutasa (SOD) o ambas. La mieloperoxidasa (MPO) dependiente de oxihaluro, como el ácido hipocloroso (HOCl) es generada por la reacción de H_2O_2 con abundantes iones de Cl^-

tomados del líquido extracelular; secundariamente aminas cloradas son generadas por la reacción de HOCl con componentes que contienen nitrógeno⁹⁰.

1.3.6.1.2 Metabolitos intermediarios reactivos de nitrógeno. Los neutrófilos presentan metabolitos intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN). El mecanismo dependiente de nitrógeno, se inicia por la enzima óxido nítrico sintasa (NOs, por sus siglas en Inglés) de la cual se conocen 2 isoformas constitutivas (cNO2, por sus siglas en Inglés, también llamadas NOS1) y una inducible (iNOs, por sus siglas en Inglés, también llamada NOS2) La isoforma iNOs es la involucrada directamente en la producción de óxido nítrico (ON) y destrucción de microorganismos intracelulares⁹¹.

1.3.6.2 Mecanismos no oxidativos

Los neutrófilos contienen abundantes enzimas hidrolíticas y polipéptidos antimicrobianos (Cuadro 3). Hidrolasas ácidas y defensinas están contenidas dentro de los gránulos. Los gránulos azurofílicos contienen muchas enzimas proteolíticas y sacarolíticas, capaces de digerir proteínas estructurales microbianas y mucopolisacáridos, donde los contenidos de los gránulos específicos incluyen proteínas como lisozima y colagenasa, las cuales destruyen los componentes que envuelven la célula⁹².

Cuadro 3. Proteínas presentes en los gránulos de los neutrófilos

Gránulos Azurofílicos (Primarios)	Gránulos Específicos (Secundarios)	Gránulos Terciarios
Mieloperoxidasa	Fosfatasa alcalina	Tetranectina
Fosfatasa ácida	Histaminasa	Fosfatasa alcalina latente
Glucosaminidasa	Colagenasa	Gelatinasa
5'-Nucleotidasa	Proteína que fija vitamina B ₁₂	
α-Monosidasa	Receptor laminina	
Arilsulfatasa	Receptor C3Bi	
α-Fucosidasa	FMLP	
Esterasa	Lactoferrina	
Catepsina G	Citocromo b245	
Elastasa	Flavoproteínas	
Histonasa	Lisozima	
Fosfolipasa A		
Proteínas catiónicas		
Proteína que incrementa la permeabilidad (BPI)		
Defensinas		
Glicosaminoglicano		
Sulfato de condroitina		
Sulfato de heparina		
Lisozima		

Tomado de. Cohen MS. Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. Clin Infect Dis 1994,18(Suppl 2):S170-179.

Las enzimas hidrolíticas en neutrófilos aumentan el daño microbiano iniciado por IRO y participan en la digestión de microorganismos muertos y células dañadas del huésped. Las proteasas de serina como lo es elastasa y catepsina G hidrolizan proteínas de la pared celular bacteriana y la lisozima degrada componentes del polisacárido. Las enzimas también pueden limitar la diseminación de la inflamación dentro del microambiente local por degradación de agentes primarios como lo es el TNF- α y linfotóxina⁹³. Catepsina G también contribuye a la muerte bacteriana a través de un mecanismo independiente de la actividad enzimática⁹⁴. La proteína que incrementa la permeabilidad bacteriana (BPI, por sus siglas en Inglés) se encuentra presente en los gránulos primarios⁹⁵.

La potente actividad lítica de la BPI en las bacterias Gram negativo, se debe a su alta afinidad (< 10 nM) de BPI para el lipopolisacárido bacteriano⁹⁶.

Las defensinas, las cuales constituyen 30-50% de las proteínas de los gránulos azurofílicos, son pequeños péptidos antimicrobianos tóxicos contra una amplia variedad de bacterias, hongos y algunos virus. Su toxicidad puede ser debida a la permeabilización de membrana de la célula blanco⁹⁷.

1.3.6.3 Interacción entre mecanismos dependientes e independientes de oxígeno

Los procesos oxidativos y no oxidativos pueden destruir algunos microorganismos de manera independiente, pero la combinación de los dos incrementa substancialmente el potencial de destrucción microbiana de los neutrófilos. Desgraciadamente, el potencial de daño en el tejido del huésped también se incrementa. De hecho, la interacción cooperativa es vital en muchos casos. Bacterias Gram negativas, por ejemplo, son resistentes a la lisozima a menos que sea expuesto simultáneamente a oxidantes, factores del complemento o ambos⁹⁷. Oxidantes clorados también sostienen la actividad de algunas proteasas⁹⁰. Las proteasas de serina como la elastasa constituyen una parte del circuito regulador que modula las funciones oxidativas y fagocíticas de neutrófilos, la activación de linfocitos y las actividades de factores del complemento⁹⁸.

En las aves, el grupo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) incluye a los heterófilos, equivalente a los neutrófilos en mamíferos, eosinófilos y basófilos, siendo estos dos últimos fenotipos celulares muy escasos⁹⁹.

1.3.7 Mecanismos microbicidas descritos en heterófilos

El contenido de los gránulos de los heterófilos sanguíneos aviares está presente en dos principales tipos de gránulos o posiblemente tres (Cuadro 4) Los

gránulos largos son elípticos (0.8 a 3 μm) y contienen péptidos catiónicos lisozima, fosfatasa ácida y mieloperoxidasa, pero carecen de fosfatasa alcalina^{100, 101, 102, 103, 104, 105, 106}. Los gránulos pequeños son esféricos (0.2 a 1 μm) contienen hidrolasa ácida como lo es β -glucoronidasa¹⁰⁰. Catepsina y α -glucosidasa activa están presentes en heterófilos, pero no ha sido designado a cual de los dos tipos de gránulos pertenece^{100, 103}.

Cuadro 4. Proteínas presentes en los gránulos de los heterófilos

Gránulos Azurófilicos (Primarios)	Gránulos Específicos (Secundarios)	Gránulos Terciarios
Mieloperoxidasa (Lam, 1997)	Hidrolasa ácida (Brune, 1973)	Gelatinasa (Rath <i>et al</i> 1998)
Fosfatasa ácida	β -glucoronidasa (Brune, 1973)	
Esterasa (Topp <i>et al</i> 1972)	Colagenasa (Rath <i>et al.</i> , 1998)	
Proteínas catiónicas (Évans <i>et al.</i> , 1994)		
β -Defensinas (Évans <i>et al</i> 1994)		
Catepsina (Brune, 1973)		
α -glucosidasa		
Lisozima		

La presencia de las proteínas catiónicas con actividad bactericida en los gránulos de los neutrófilos en mamíferos se conoce desde hace más de 20 años, pero las proteínas no habían sido purificadas y caracterizadas^{110, 111, 100}. Estas proteínas catiónicas son localizadas en los gránulos largos elípticos de los heterófilos^{112, 113}. Extractos crudos de gránulos heterofílicos destruyen, *in vitro*, a *E. coli*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus albus* a concentraciones de 20 a 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁰⁰. Heterófilos lisados son capaces de destruir, *in vitro*, a *E. coli* y *S. aureus*, pero no es efectivo para destruir *P. multocida*; sin embargo heterófilos intactos pueden destruir completamente las tres bacterias¹¹⁴.

Por otra parte los miembros de un grupo de gránulos heterofílicos aviares son los péptidos antimicrobianos que han sido purificados y caracterizados. Estos péptidos son llamados gallinacinas (Gal 1- α , Gal 1, Gal 2), péptidos antimicrobianos de heterófilos de pollo (CHP 1, CHP 2) y péptidos antimicrobianos de heterófilos de pavo (THP 1, THP 2, THP 3)^{115, 108}. Los ocho péptidos pertenecen a la clase de péptidos antimicrobianos de β -defensinas. Como grupo, las defensinas tienen un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, protozoarios, hongos, y algunas veces hacia los virus^{116, 117}

1.4 JUSTIFICACIÓN

Dado que el heterófilo es la primera línea celular de defensa, que posee mecanismos microbicidas que no requieren ser activados, se estudió, *in vitro*, si *Salmonella gallinarum* puede sobrevivir en los heterófilos como es bien conocido en los neutrófilos de mamíferos

1.5 HIPÓTESIS

Debido a que los pollos Leghorn son resistentes a la infección por *Salmonella* spp y que los heterófilos han mostrado tener capacidad lítica hacia otros microorganismos, entonces *Salmonella gallinarum* sobrevivirá dentro de heterófilos.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 GENERAL

- Evaluar la capacidad de sobrevivencia y multiplicación de *Salmonella gallinarum* dentro de heterófilos de pollo Leghorn.

1.6.2 PARTICULAR

- Evaluar la capacidad fagocítica de los heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn hacia la cepa silvestre patógena de *S. gallinarum*.

2.0 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales. Se usaron gallinas adultas de 40 a 50 semanas de edad de la estirpe Leghorn blanca, clínicamente sanas; alojadas en una de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las aves fueron alimentadas con una ración balanceada sin medicar y con agua *ad libitum*

2.2 Aislamiento de heterófilos a partir de sangre periférica. Los heterófilos fueron obtenidos a partir de 10 mL de sangre completa con EDTA al 10% (SIGMA). Para el aislamiento de las células, la sangre se obtuvo asépticamente de la vena braquial con jeringa de 10 mL y aguja de 22 X 32 mm y fue diluida en un volumen igual de medio de cultivo celular DMEM a 41°C (GIBCO).

El procedimiento basado en la sedimentación de células mediante gradientes de una suspensión coloidal de partículas de sílice con polivinilpirrolidona, Percoll™, es totalmente inocuo para las células, por lo cual se utilizó la técnica para la obtención de heterófilos de sangre periférica descrita por Mills y Wilcox¹¹⁸, con algunas modificaciones que se describen brevemente a continuación: se preparó una solución madre adicionando 9 volúmenes de Percoll (densidad 1.13 g mL⁻¹) (SIGMA) a un volumen de solución salina amortiguadora de Hanks' (GIBCO) concentrada 10 x, sin Ca²⁺ y Mg²⁺. De dicha solución se preparó la solución de trabajo a una concentración del 70% (densidad 1.087 g mL⁻¹) y 80% (densidad 1.110 g mL⁻¹). Se colocó 3 mL de cada gradiente discontinuo en tubos de plástico para centrifuga de 12 mL. Se colocó 3 mL de la sangre mezclada con DMEM (GIBCO) sobre los gradientes, posteriormente se centrifugó a 550 x g por 20 minutos a 20° C. Los heterófilos se colectaron entre la interfase de los gradientes de Percoll. Las

1 6.2 PARTICULAR

- Evaluar la capacidad fagocítica de los heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn hacia la cepa silvestre patógena de *S. gallinarum*.

2.0 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales. Se usaron gallinas adultas de 40 a 50 semanas de edad de la estirpe Leghorn blanca, clínicamente sanas; alojadas en una de las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las aves fueron alimentadas con una ración balanceada sin medicar y con agua *ad libitum*

2.2 Aislamiento de heterófilos a partir de sangre periférica. Los heterófilos fueron obtenidos a partir de 10 mL de sangre completa con EDTA al 10% (SIGMA). Para el aislamiento de las células, la sangre se obtuvo asépticamente de la vena braquial con jeringa de 10 mL y aguja de 22 X 32 mm y fue diluida en un volumen igual de medio de cultivo celular DMEM a 41°C (GIBCO).

El procedimiento basado en la sedimentación de células mediante gradientes de una suspensión coloidal de partículas de sílice con polivinilpirrolidona, Percoll™, es totalmente inocuo para las células, por lo cual se utilizó la técnica para la obtención de heterófilos de sangre periférica descrita por Mills y Wilcox¹¹⁸, con algunas modificaciones que se describen brevemente a continuación: se preparó una solución madre adicionando 9 volúmenes de Percoll (densidad 1.13 g mL⁻¹) (SIGMA) a un volumen de solución salina amortiguadora de Hanks' (GIBCO) concentrada 10 x, sin Ca²⁺ y Mg²⁺. De dicha solución se preparó la solución de trabajo a una concentración del 70% (densidad 1.087 g mL⁻¹) y 80% (densidad 1.110 g mL⁻¹). Se colocó 3 mL de cada gradiente discontinuo en tubos de plástico para centrifuga de 12 mL. Se colocó 3 mL de la sangre mezclada con DMEM (GIBCO) sobre los gradientes, posteriormente se centrifugó a 550 x g por 20 minutos a 20° C. Los heterófilos se colectaron entre la interfase de los gradientes de Percoll Las

células fueron lavadas dos veces en DMEM a 250 x g por 10 min a 41° C y fueron resuspendidas en DMEM suplementado con 10% de suero de pollo (el complemento fue inactivado por calor a 56 °C por 30 min) (GIBCO) a 41° C con 5% de CO₂. El medio recibirá el nombre de DMEM-10. La pureza y viabilidad de las células se determinaron por la coloración de exclusión de azul de tripano (SIGMA)

2.3 Preparación de la bacteria. Se usó la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* (cepa U2) altamente virulenta para pollos de engorda neonatos, obtenida en el Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Una colonia de la bacteria fue crecida en 10 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB-DIFCO), incubada por 16 h, a 37° C y en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo, se transfirieron 100 µL del cultivo a un matraz con 10 mL de TSB fresco y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones por 3 h para alcanzar la fase logarítmica temprana. La bacteria fue posteriormente lavada con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y centrifugación a 41°C dos veces. La bacteria fue resuspendida en PBS a 41°C y ajustada a 600 nm en un espectrofotómetro a una concentración de 10⁹ unidades formadoras de colonia (UFC)/mL y mantenida a 41°C antes de su uso.

2.4 Capacidad fagocítica de los heterófilos provenientes de sangre periférica.

En placa de 96 pozos se depositaron 1x10⁶ heterófilos por pozo en 100 µL de medio DMEM-10 con HEPES 10 mM (SIGMA) a 41°C y 5% de CO₂, inmediatamente después, fueron infectados con diferentes concentraciones de bacteria, 1:1, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, para conocer la máxima capacidad fagocítica de los heterófilos. Para sincronizar la infección, la placa fue centrifugada a 1000 rpm por 5 min entre 39 a 41°C y posteriormente incubada a 41°C con 5% de CO₂ por 30 min para permitir la fagocitosis. Para quitar el exceso de bacterias no internadas, cada pozo fue lavado 2 veces con medio DMEM con 250 µg/mL de gentamicina (Shering Ploug), al final de los lavados se agregaron 100 µL de medio DMEM con 250µg/mL de gentamicina y se mantuvieron en cultivo a 41°C con 5% de CO₂ por 30 min para eliminar el resto de bacterias no internadas. Después se

procedió a lavar 2 veces cada pozo con DMEM para quitar el antibiótico. Para determinar la cantidad de bacterias presente dentro de los heterófilos se lisaron las células. El lisado celular se llevó a cabo con 1 mL de PBS con Tritón X-100 al 20% (J.T BAKER) por un minuto en un mezclador. Del lisado se realizaron diluciones decuples seriadas para ser sembradas en agar de soya tripticaseína (TSA-DIFCO) en cajas de Petri y se incubaron por 24 h a 37°C para conteo de UFC.

2.5 Supervivencia de *Salmonella gallinarum* dentro de los heterófilos. Para determinar la capacidad de *S. gallinarum* para sobrevivir dentro de los heterófilos, las células fagocíticas y las bacterias se incubaron juntas como se describió anteriormente para el ensayo de fagocitosis. Sin embargo, posterior a la remoción de las bacterias no internadas por lavados e incubación con medio con gentamicina, las placas fueron incubadas a 41°C con 5% de CO₂ por 1, 2, 3 y 4 h y fueron sembradas como se describió anteriormente para su cuantificación

3.0 RESULTADOS

3.1 Capacidad fagocítica de los heterófilos. Como se muestra en la figura 3, los heterófilos de pollo Leghorn, fueron capaces de fagocitar, *in vitro*, a *S. gallinarum* desde 10 hasta 100 UFC, siendo la máxima capacidad fagocítica de los heterófilos con la bacteria de 1:100. Es importante señalar, como se muestra en la gráfica, que existe menor número de bacterias cuando se utilizó la relación 1:200, aun por debajo de la relación 1:10.

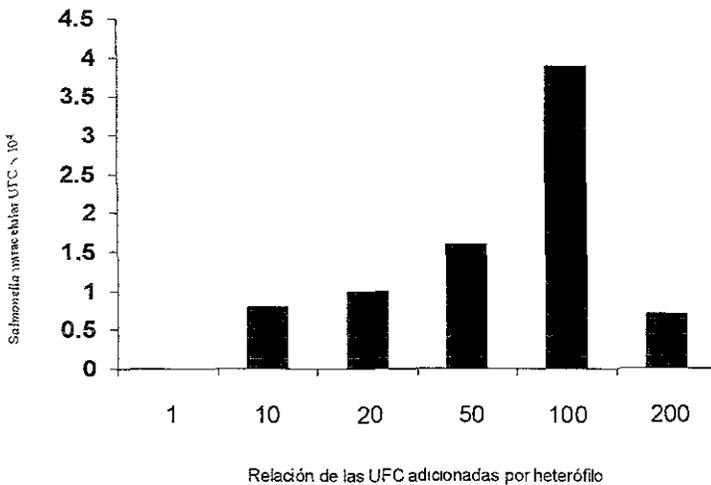


Figura 3. Capacidad de los heterófilos de pollo Leghorn para fagocitar la cepa silvestre de *S. gallinarum* U2. Los 10^6 heterófilos fueron infectados con diferentes concentraciones de bacteria por 30 min a 41°C. Después de eliminar las bacterias no internadas, las células fueron lisadas para recuperar la bacteria viva. La bacteria fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar de soya tripticaseína (TSA-DIFCO)

3.2 Sobrevivencia de *S. gallinarum* dentro de los heterófilos. Como se muestra en la figura 4, *S. gallinarum* fue capaz de sobrevivir pero no de multiplicarse dentro de los heterófilos de pollo Leghorn, aislados de sangre periférica durante 4 h.

También se observó que los heterófilos destruyeron al 65% de las bacterias intracelulares durante los primeros 60 min de incubación. Posteriormente, *S. gallinarum* se mantuvo intracelularmente hasta 4 h posinfección.

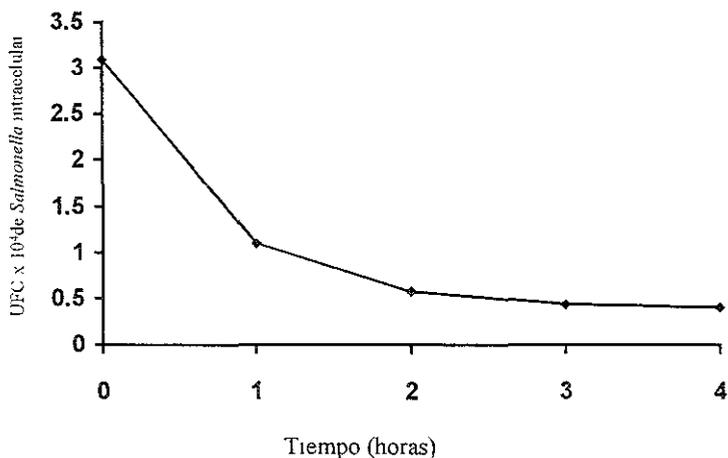


Figura 4. Supervivencia intracelular de la cepa silvestre de *S. gallinarum* U2 en los heterófilos de pollo Leghorn. 1×10^6 heterófilos fueron infectados con una relación célula bacteria de 1:100. Después de la fagocitosis y remoción de las bacterias extracelulares las células fueron lisadas a diferentes tiempos para recuperar la bacteria viva. La bacteria fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar de soya tripticaseína.

4.0 DISCUSIÓN

Este es el primer estudio donde se describe la supervivencia intracelular de *Salmonella gallinarum* en heterófilos de pollo Leghorn obtenidos de sangre periférica. De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se observa que los heterófilos de pollo Leghorn no activados, fagocitan y permiten la

También se observó que los heterófilos destruyeron al 65% de las bacterias intracelulares durante los primeros 60 min de incubación. Posteriormente, *S. gallinarum* se mantuvo intracelularmente hasta 4 h posinfección

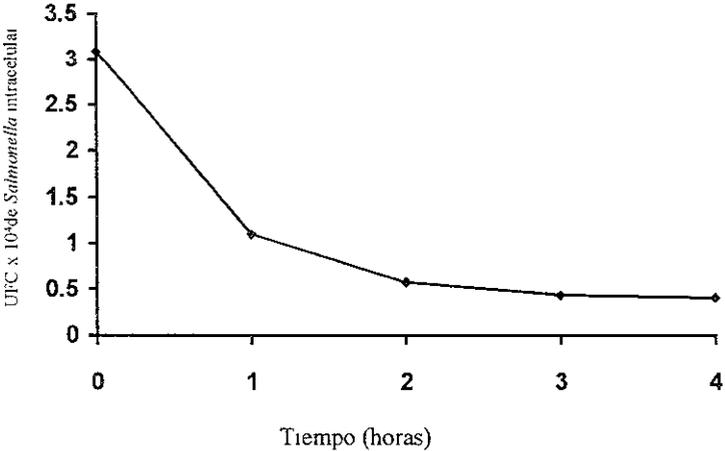


Figura 4 Sobrevivencia intracelular de la cepa silvestre de *S. gallinarum* U2 en los heterófilos de pollo Leghorn. 1 x 10⁶ heterófilos fueron infectados con una relación célula bacteria de 1:100 Después de la fagocitosis y remoción de las bacterias extracelulares las células fueron lisadas a diferentes tiempos para recuperar la bacteria viva. La bacteria fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar de soya tripticaseína.

4.0 DISCUSIÓN

Este es el primer estudio donde se describe la sobrevivencia intracelular de *Salmonella gallinarum* en heterófilos de pollo Leghorn obtenidos de sangre periférica De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se observa que los heterófilos de pollo Leghorn no activados, fagocitan y permiten la

sobrevivencia de la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* U2, hasta por un periodo de 4 h, pero no de multiplicarse de manera intracelular.

Los pollos después de los 7 días de edad incrementan su resistencia natural hacia a la infección por *Salmonella*, este mecanismo de resistencia aún no ha sido dilucidado. Sin embargo se sabe que cuando *Salmonella enteritidis* es administrada intravenosamente y alcanza el sistema fagocitario mononuclear éste rápidamente controla a la bacteria *per se*¹¹⁹. Lo mismo es observado en los pollos Leghorn de un día de edad, que son desafiados con *S. enteritidis* por la vía natural con una dosis de 4×10^8 UFC/mL, siendo resistentes a la infección (García-Espinosa G, observaciones clínicas y experimentales no publicadas). Se sabe que los macrófagos y heterófilos del bazo, los monocitos y heterófilos de sangre periférica de pollos adultos fagocitan y tienen una actividad bactericida contra *Salmonella enteritidis*^{120, 121}, lo que ha sugerido que éstas células participarían en la resistencia del huésped hacia la bacteria. Sin embargo, el papel del heterófilo como célula huésped ante la infección con *Salmonella* no es conocido. Diversos investigadores han descrito algunos factores de virulencia presentes en *Salmonella gallinarum*, como el plásmido de alto peso molecular (85 kb)¹²². Los genes del plásmido de virulencia de la subunidad estructural menor de la fimbria FaeH y FaeI¹³; los genes pipA, pipB y pipD pertenecientes a la IPS-5¹⁶. Sin embargo hasta el momento no ha sido caracterizada la IP-3 en *S. gallinarum*, en *S. typhimurium* participa en la sobrevivencia intracelular en los fagocitos profesionales. Tampoco ha sido caracterizada la IP-2 en *S. gallinarum*, en *S. typhimurium* participa en la multiplicación intracelular en los fagocitos profesionales. La ausencia de multiplicación intracelular de *S. gallinarum* observada en el presente estudio podría ser debido a una rápida respuesta de los mecanismos microbicidas de los heterófilos. Debido a que se ha reportado un aumento considerable de las UFC en bazo e hígado de pollos neonatos susceptibles y la presencia de proteínas codificadas por genes cromosomales de *Salmonella gallinarum* que participan en el incremento del número de UFC en los órganos blanco¹²², es probable que la multiplicación intracelular sea bloqueada por

el heterófilo de pollos Leghorn. La presencia de los mecanismos microbicidas de los heterófilos hacen pensar que ellos serían los responsables de bloquear la multiplicación bacteriana, sin embargo se ha observado que los mecanismos microbicidas de los neutrófilos de humanos no son suficientes para bloquear la multiplicación de *Salmonella typhimurium*¹²³, probablemente los heterófilos tengan algún mecanismo más rápido y eficiente para controlar la bacteria intracelular que los neutrófilos de humano. En estudios, *in vitro*, se ha observado el mismo comportamiento microbicida en macrófagos de pollo no activados (García-Espinosa, sometido a publicar en FEMS).

Cuando se determinó la capacidad fagocítica de los heterófilos hacia *Salmonella gallinarum*, es interesante observar la pobre capacidad fagocítica de los heterófilos hacia la *Salmonella* específica de la especie, se ha observado el mismo comportamiento en macrófagos de pollo no activados (García-Espinosa, sometido a publicar en FEMS), asimismo se observa mayor fagocitosis en la relación célula:bacteria 1:100, en comparación con las relaciones 1:10, 1:20, 1:50, sin embargo en la relación 1:200 existe menor número de bacterias, aun por debajo de la relación 1:10, sugiriendo que posiblemente a ésta concentración bacteriana *Salmonella gallinarum* produzca un efecto de tóxico en el heterófilo, como ha sido observado en neutrófilos de humano que fagocitan *Salmonella typhimurium*¹²³.

Se ha observado que los pollos Leghorn son resistentes en forma natural a la enfermedad causada por *Salmonella gallinarum*¹²⁴, *Salmonella enteritidis* (García-Espinosa G, sometido a publicar en Acta Vet) y *Salmonella typhimurium*¹⁰, sin conocer actualmente el mecanismo involucrado. Debido a la ausencia de enfermedad a altas concentraciones de *Salmonella* administrada a estos pollos, el mecanismo de resistencia está involucrado en la etapa temprana de la infección sin embargo no se conoce la participación de la inmunidad celular innata, después de la internación de la *Salmonella* al tracto intestinal.

Este es el primer estudio donde se describe la sobrevivencia intracelular de *Salmonella gallinarum* en heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn, sin embargo es necesario realizar experimentos con heterófilos de aves jóvenes y de estirpes semipesadas y de pollos de engorda, los cuales son susceptibles a la infección por *Salmonella gallinarum* y así obtener elementos para conocer el papel del heterófilo en aves susceptibles. De igual forma, estudiar otras especies de *Salmonella* como *enteritidis*, *pullorum*, *typhimurium*, para conocer su comportamiento intracelular, en esta célula fagocítica profesional.

5.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo, se puede concluir que *Salmonella gallinarum* U2 es capaz de sobrevivir pero no de multiplicarse intracelularmente en heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn.

Estos resultados indican que el heterófilo puede ser utilizado como una célula huésped por *Salmonella gallinarum*.

6.0 LITERATURA CITADA.

- 1 Hook EW. Principles and practice of infectious diseases. *Salmonella* species (including thypoid fever). In Mendell, GL, Douglas RG, Bennett JE edd 3rd edd, New York: Churchill Livingstone, NY, 1990;1700-1716
2. Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium* Am J Pathol 1967;50:109-136.
3. Lin F-R, Wang X-M, Hsu HS, Mumaw VR, Nakoneczna I Electron microscopic studies on the location of bacterial proliferation in the liver in the murine salmonellosis Br J Exp Pathol 1987;68:539-550

Este es el primer estudio donde se describe la sobrevivencia intracelular de *Salmonella gallinarum* en heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn, sin embargo es necesario realizar experimentos con heterófilos de aves jóvenes y de estirpes semipesadas y de pollos de engorda, los cuales son susceptibles a la infección por *Salmonella gallinarum* y así obtener elementos para conocer el papel del heterófilo en aves susceptibles. De igual forma, estudiar otras especies de *Salmonella* como *enteritidis*, *pullorum*, *typhimurium*, para conocer su comportamiento intracelular, en esta célula fagocítica profesional.

5.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo, se puede concluir que *Salmonella gallinarum* U2 es capaz de sobrevivir pero no de multiplicarse intracelularmente en heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn.

Estos resultados indican que el heterófilo puede ser utilizado como una célula huésped por *Salmonella gallinarum*.

6.0 LITERATURA CITADA.

1. Hook EW. Principles and practice of infectious diseases. *Salmonella* species (including thypoid fever). In Mendell, GL, Douglas RG, Benett JE. edd 3rd edd, New York: Churchill Livingstone, NY, 1990,1700-1716.
2. Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium* Am J Pathol 1967,50:109-136.
3. Lin F-R, Wang X-M, Hsu HS, Mumaw VR, Nakoneczna I. Electron microscopic studies on the location of bacterial proliferation in the liver in the murine salmonellosis. Br J Exp Pathol 1987;68:539-550

Este es el primer estudio donde se describe la sobrevivencia intracelular de *Salmonella gallinarum* en heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn, sin embargo es necesario realizar experimentos con heterófilos de aves jóvenes y de estirpes semipesadas y de pollos de engorda, los cuales son susceptibles a la infección por *Salmonella gallinarum* y así obtener elementos para conocer el papel del heterófilo en aves susceptibles. De igual forma, estudiar otras especies de *Salmonella* como *enteritidis*, *pullorum*, *typhimurium*, para conocer su comportamiento intracelular, en esta célula fagocítica profesional.

5.0 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo, se puede concluir que *Salmonella gallinarum* U2 es capaz de sobrevivir pero no de multiplicarse intracelularmente en heterófilos provenientes de sangre periférica de pollo Leghorn.

Estos resultados indican que el heterófilo puede ser utilizado como una célula huésped por *Salmonella gallinarum*.

6.0 LITERATURA CITADA.

- 1 Hook EW. Principles and practice of infectious diseases. *Salmonella* species (including thypoid fever). In Mendell, GL, Douglas RG, Benett JE edd 3rd edd, New York: Churchill Livingstone, NY, 1990;1700-1716
2. Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium* Am J Pathol 1967,50:109-136.
3. Lin F-R, Wang X-M, Hsu HS, Mumaw VR, Nakoneczna I. Electron microscopic studies on the location of bacterial proliferation in the liver in the murine salmonellosis. Br J Exp Pathol 1987;68:539-550.

4. Conlan JW y North RJ. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes of leukocytes. *Infect Immun* 1992;60:5164-5171
5. Dunlap EN, Benjamin W Jr., Berry AK, Eldridge JH, Briles DE. A "safe-site" for *Salmonella typhimurium* is within splenic polymorphonuclear cells. *Microb Pathog* 1992;13:181-190.
6. Verjan GMM, Ringrose JH, van Alphen L, Feltkamp TEW, Kusters JG. Entrance and survival of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* within human B- and T-cell lines. *Infect Immun* 1994;62:2229-2235.
7. Smith, HW. Observations on experimental fowl typhoid. *J Comp Pathol* 1955,65:37-54.
8. Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect Immun* 1994,62 4602-4610.
9. Smith, HW, Tucker JF. The virulence of *Salmonella* strains for chickens: their excretion by infected chickens. *J Hyg* 1980;84.479-488
10. Ziprin RL, Corrier DE, Elissalde MH. Maturation of resistance to Salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by Cyclosporine. *Poult Sci* 1989;68:1637-1642.
11. Zhang-Barber L, Turner AK, Dugan G, Barrow PA. Protection of chicken against experimental fowl typhoid using a *nouG* mutant of *Salmonella* serotype *gallinarum*. *Vaccine* 1998;16:899-903.
12. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, Binns MM. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun* 1987;55:388-92
13. Rychlik I, Lovell MA, Barrow PA. The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* and *faeI* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998;159.255-260.
14. Boyd EF, Wang FS, Whittam TS, Selander RK. Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:804-808

15. Li J, Ochman H, Groisman EA, Boyd EF, Solomon F, Nelson K, Selander RK. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7252-7256
16. Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. Mol Microbiol 1998;29:883-891
17. Jones BD, Falkow S. Salmonellosis - host immune responses and bacterial virulence determinants. Annu Rev Immunol 1996;14:533-561.
18. Galan JE. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. Curr Top Microbiol Immunol 1996;209:43-60.
19. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science 1997;276:718-725.
20. Groisman EA, Ochman H. Pathogenicity island - bacterial evolution in quantum leaps. Cell 1997;87:791-794.
21. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62:379-433.
22. Kaper JB. EPEC delivers the goods. Trends Microbiol 1998;6:169-172.
23. Cornelis GR. The *Yersinia* deadly kiss. J Bacteriol 1998;180:5495-5504.
24. Galan JE, Curtiss RD. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:6383-6387.
25. Hardt WD, Urlaub H, Galan JE. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:2574-2579.
26. Finlay BB, Ruschkowski S, Dedhar S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. J Cell Sci 1991;99:283-296.
27. Hueck CJ, Hantman MJ, Bajaj V, Johnston C, Lee CA, Miller SI. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. Mol Microbiol 1995;18:479-490.

28. Collazo CM, Galan JE Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 1996;64:3524-3531
29. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:14057-14059.
30. Zhou D, Mooseker MS, Galan JE. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. Science 1999;283:2092-2095
31. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2593-2597.
32. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. Mol Microbiol 1998;30:175-188
33. Hensel M, et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. Mol Microbiol 1998;30:163-174
34. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. J Bacteriol 1999;181:998-1004.
35. Blanc-Potard AB, Groisman EA. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. EMBO J 1997;16:5376-5385.
36. Wong KK, McClelland M, Stillwell LC, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. Infect Immun 1998;66:3365-3371.
37. Hong KH, Miller VL. Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella* ipgDE. J Bacteriol 1998;180:1793-1802.
38. Guilloteau LA, Wallis TS, Gautier AV, MacIntyre S, Platt DJ, Lax AJ. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lyses of

2000-11-10 10:00 AM
 2000-11-10 10:00 AM

- macrophages and influences inflammatory responses. *Infect Immun* 1996;64:3385-3393.
39. Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992;174:1-7.
40. Cotter PA, Miller JF. *In vivo* and *ex vivo* regulation of bacterial virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:17-26.
41. Soncini FC, Groisman EA. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol* 1996;178:6796-6801.
42. Gunn JS, Miller SI. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 1996;178:6857-6884.
43. Johnston C, Pegues DA, Hueck CJ, Lee A, Miller SI. Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol* 1996;22:715-727.
44. Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4197-4201.
45. Mills SD, Ruschkowski SR, Stein MA, Finlay BB. Trafficking of porin-deficient *Salmonella typhimurium* mutants inside HeLa cells: *ompR* and *envZ* mutants are defective for the formation of *Salmonella*-induced filaments. *Infect Immun* 1998;66:1806-1811.
46. Ahmer BMM, van Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Heffron F. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* 1999;31:971-982.
47. Garcia Vescovi E, Bland AP, Wallis TS. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol* 1997;34:369-386.
48. Kohbata S, Yokobata H, Yabuchi E. Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 1986;30:1225-1237.

49. Jones BD, Ghori N, Falkow S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994;180:15-23.

50. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells *Res Microbiol* 1994;145:543-552

51. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996;86:345-348

52. Jepson MA, Clark MA. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol* 1998;6:359-365.

53. Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome of T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 1996;183:237-247.

54. Ruedl C, Rieser C, Bock G, Wick G, Wolf G. Phenotypic functional characterization of CD11c⁺ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol* 1996;26:1801-1806.

55. Fields PI, Swanson RW, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5189-5193.

56. Buchmeier NA, Heffron F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1991;59:2232-2238.

57. Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahi PD, Grosman EA. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 1999,18:3924-3933.

58. Isibashi Y, Arai T. *Salmonella typhi* does not inhibit phagosome-lysosome fusion in human monocyte-derived macrophages *FEMS Immunology and Microbiology* 1995,12:55-62.

59. Oh Y, Alpuche-Aranda CM, Berthiaume E, Jinks T, Miller SI, Swanson JA. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1996;64:3877-3883

60. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Morad Daniel Gunn JS, Hackett M, Miller S Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 1998;95:189-198.
61. Gunn JS, Belden WJ, Miller SI Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microbial Pathogenesis* 1998;25:77-90.
62. Richter-Dahlfors A, Buchan AMJ, Finlay BB. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo* *J Exp Med* 1997;186:569-580.
63. Wallis TS, Paulin SM, Plested JS; Watson PR, Jones PW. The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect Immun* 1995;63:2755-2761.
64. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* 1993;7:825-830.
65. MacNee W, Selby C Neutrophil kinetics in the lungs. *Clin Sci* 1990;79 79-107
66. Christa HE, Homburg B, Dirk R. Apoptosis of neutrophils. *Curr Opin Hematol* 1996;3:94-99.
67. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131-136.
68. Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B⁴ by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250:598-605
69. Anderson BO, Brown JM, Harken AH Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res* 1991;51:170-179.
70. Meyrick B, Brigham KL. Acute effects of *Escherichia coli* endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep Structure function relationships. *Lab Invest* 1983, 48:458-470.

71. Movat HZ, Burrowes CE, Cybulsky MI, Dinarello CA. Acute inflammation and a Schwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am J Pathol* 1987; 129:463-476
72. Allen LAH y Aderem A. Mechanisms of phagocytosis *Curr Opin Immunol* 1996;8:36-40.
73. Tjelle TE, Løvdal T, Berg T. Phagosome dynamics and function. *BioEssays* 2000; 22:255-263.
74. Daeron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203-234.
75. Wright SD, Griffin FM, Jr. Activation of phagocytic cells C3 receptors for phagocytosis. *J Leukoc Biol* 1985;38:327-339.
76. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.
77. Mosser DM. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition *Immunol Ser* 1994;60:99-114.
78. Czop JK, Kay J. Isolation and characterization of β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1991;173:1511-1520.
79. Koib-Bachofen V. Uptake of toxic silica particles by isolated rat liver macrophages (Kupffer cells) is receptor mediated and can be blocked by competition. *J Clin Invest* 1992;90:1819-1824.
80. Allison AC, Davies P, De Petris S. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nat New Biol* 1971;232:153-155.
81. Sheterline P, Rickard JE, Richards RC. Fc receptor-directed phagocytic stimuli induce transient actin assembly at an early stage of phagocytosis in neutrophil leucocytes. *Eur J Cell Biol* 1984;34:80-87
82. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol* 1995;5:89-92.
83. Kaplan G. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol* 1977;6:797-807

84. Allen LAH, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 1996;184:627-637.
85. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 1994;124:677-688.
86. Oh YK, Swanson JA. Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes. *J Cell Biol* 1996;132:585-593.
87. Tjelle TE, Saigal B, Froystad M, Berg T. Degradation of phagosomal components in late endocytic organelles. *J Cell Sci* 1998;111:141-148.
88. Krause K-H, Lew DP. Bacterial toxins and neutrophil activation. *Semin Hematol* 1988;25:112-124.
89. Babior BM. The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol* 1992;65:49-95.
90. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
91. MacMicking J, Qiao-wen, Nathan C. Antimicrobial actions of NOS2. *Annu Rev Immunol* 1997;15:333-339.
92. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol* 1993;51:187-198.
93. Scuderi P, Nez PA, Duerr ML, Wong BJ, Valdez CM. Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol* 1991;135:299-313.
94. Miyasaki KT, Bodeau AL. In vitro killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp by human neutrophil cathepsin G and elastase. *Infect Immun* 1991;59:3015-3020.
95. Weersink AJ, van Kessel KP, van den Tol ME, van Strijp JA, Torensma R, Verhoer J, Elsbach P, Weiss J. Human granulocytes express a 55-kDa lipopolysaccharide-binding protein on the cell surface that is identical to the bactericidal/permeability-increasing protein. *J Immunol* 1993;150:253-263.
96. Gazzano-Santoro H, Parent JB, Grinna L, Horwitz A, Parsons T, Theofan G, Elsbach P, Weiss J, Conlon PJ. High-affinity binding of the

- bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1992;60:4754-4761.
97. Lehrer RI, Granz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 1990;76:2169-2181.
98. Kusner DJ, Aucott JN, Franceschi D, Sarasua MN, Spagnuolo PJ, King CH. Protease priming of neutrophil superoxide production. *J Biol Chem* 1991;266:16465-16471.
99. Sturkie PD y Griminger P. *Body fluid blood. In: Avian Physiology 4th ed. Edited by Sturkie PD, 102-121. Springer-Verlag, New York, U.S.A., 1986*
100. Brune K, Spitznagel JK Peroxidaseless chicken leukocytes: Isolation and characterization of antibacterial granules. *J Infect Dis* 1973;127:84-94
101. Rausch PG, Moore TG Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. *Blood* 1975;46:913-919.
102. Daimon T, Claxton-Martins A. Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leukocytes *J Anat* 1977;123:553-562.
103. Fujimori K, Yamada M. Distribution of neutral and acid α -glucosidase of granule fractions from chicken heterophil leukocytes. *Cell Mol Biol* 1978;23:391-402
104. Maxwell MH. The distribution and localization of acid trimetaphosphatase in developing heterophils and eosinophils in the bone marrow of the fowl and the duck. *Cell Tissue Res* 1984;235:171-176.
105. Styrt B. Species variation in neutrophil biochemistry and function. *J Leukocyte Biol* 1989;46:63-74
106. Lam KM. Myeloperoxidase activity in chicken heterophils and adherent cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;57:327-335.
107. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils II. Histochemistry. *Avian Dis* 1972;16:369-373.
108. Evans EW, Beach GG, Wunderlich J, Harmon BG. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J Leukocyte Biol* 1994;56:661-665

- 109.Rath NC Huff GR, Balog JM, Huff WE. Fluorescein isothiocyanate staining and characterization of avian heterophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;64:83-95
- 110.Zeya HI y Spitznagel JK. Cationic protein-bearing granules of polymorphonuclear leukocytes: Separation from enzyme-rich granules. *Science* 1969;163:1069-1071.
- 111.Zeya HI y Spitznagel JK. Characterization of cationic protein-bearing granules of polymorphonuclear leukocytes. *Lab Invest* 1971;24:229-236.
- 112.MacRae EK y Spitznagel JK. Ultrastructural localization of cationic proteins in cytoplasmic granules of chicken and rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Cel Sci* 1973;17:79-94.
- 113.MacRae EK yPowell RE Cytochemical reaction for cationic proteins as a marker of primary granules during development in chick heterophils *Histochemistry* 1979;60:295-308.
- 114.Harmon BG,Glisson JR, Nunnally JC. Turkey macrophage and heterophil bactericidal activity against *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 1992;36:986-991.
- 115.Harwig SL, Swiderek KM, Kokryakov JN, Tan L, Lee TD, Panyutich EA, Aleshina GM, Shamova OV, Lehrer RI Gallinacins. cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Lett* 1994;342:281-285.
- 116.Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells *Ann Rev Immunol* 1993,11.105-128.
- 117.Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, Gillin FD. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* 1994;62:5397-5403.
- 118.Mills JN, Wilcox GE. Separation of phagocytic leukocytes from the peripheral blood of chickens. *Avian Pathol* 1993, 22.343-352
- 119.Girard-Santosuosso O, Menanteau P, Ducher-Suchauz M, Berthelot F, Mompарт F, Protais J, Colin P, Guillot JF, Beaumont C, Lanrier F. Variability in teh resistance of four chicken lines to experimental intravenous infection with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *A Dis* 1998;42:462-469

120. Kodama H, Sato K, Mikami T. Age-dependent resistance of chickens to *Salmonella in vitro*: phagocytic and bactericidal activities of splenic phagocytes. *Am J Vet Res* 1976;37:1091-1094.
121. Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut MH. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet Microbiol* 1994;38:293-305
122. Barrow PA. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*. *Infect Immun* 1990;58:2283-2288.
123. Chiu ChH, Ou JT. Intracellular *Salmonella typhimurium* induce lysis of human polymorphonuclear leukocytes which is not associated with the *Salomonella* virulence plasmid. *Microbiol Immunol* 1999;43 9-14.
124. Prince WR, Garren HW. An investigation of the resistance of white leghorn chicks to *Salmonella gallinarum*. *Poult Sci.* 1966;45.1149-53

Y dijo al hombre:

He aquí que el temor del Señor es la sabiduría,
Y el apartarse del mal, la inteligencia.

Job 28:28

Vuelve ahora en amistad con Él. y tendrás paz,
Y por ello te vendrá bien.
Toma ahora la ley de su boca,
Y pon sus palabras en tu corazón.
Si te volvieres al Omnipotente,
Serás edificado;
Alejarás de tu tienda la aflicción;
Tendrás más oro que tierra,
Y como piedras de arroyos oro de Ofir;
El Todopoderoso será tu defensa,
Y tendrás plata en abundancia
Porque entonces te deleitarás en el Omnipotente,
Y alzarás a Dios tu rostro
Orarás a Él, y Él te oirá;
Y tú pagarás tus votos.
Determinarás asimismo una cosa,
Y te será firme,
Y sobre tus caminos resplandecerá luz.

Job 22:21-28