



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**“Presencia de las células de Paneth en el intestino
delgado de cobayos neonatos”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Erika Giulianna PEBE GÓMEZ

Lima, Perú

2012

DEDICADO

A todos los profesionales médicos que dan su vida por descubrir el misterio de la ciencia y la naturaleza, a todos los que valoramos y respetamos la vida en diferentes formas y en especial a mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a mi directora y asesores que constantemente me apoyaron frente a diferentes retos para concretar mi tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN EN ESPAÑOL	vi
RESUMEN EN INGLÉS	vii
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1. El cobayo: distribución e importancia.....	11
2.2. Fisiología gastrointestinal del cobayo.....	13
2.3. Intestino delgado.....	14
2.3.1. Mucosa del intestino delgado.....	16
2.4. Células de Paneth	17
2.5. Diferenciación de células madres a células de Paneth.....	18
2.6. Secreción de las células de Paneth.....	19
2.6.1. Lisozimas	19
2.6.2. Fosfolipasa a2 secretoria.....	20
2.6.3. Péptidos antimicrobianos: α -defensinas.....	20
2.7. Inmunidad innata intestinal.....	23
2.8. Rol de las células de Paneth en la defensa del organismo	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Lugar de estudio	26
3.2. Animales.....	26
3.3. Materiales.....	26
3.3.1. Material para la recolección de muestras.....	26
3.3.2. Equipos y materiales para el procesamiento de muestras de histología e inmunohistoquímica.....	27
3.3.2.1. Sustancias, reactivos y colorantes:.....	27
3.3.2.2. Equipos de laboratorio:.....	27

3.4. Metodología	28
3.4.1. Sacrificio de los animales.....	28
3.4.2. Necropsia de los animales.....	28
3.4.3.Toma de muestras intestinales para histología e inmunohistoquímica	28
3.5. Procesamiento de muestras intestinales para histología.....	29
3.6. Detección de lisozima mediante inmunohistoquímica.....	29
3.7. Lectura de Láminas	30
3.8. Análisis de Datos	30
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN.....	35
VI. CONCLUSIONES	38
VII. BIBLIOGRAFÍA	39
VIII. ANEXOS	46
8.1. Procesamiento de muestras intestinales para histología e inmunohistoquímica.....	46
8.2. Coloración de las láminas para histología.....	46
8.2.1. Coloración histológica de Hematoxilina-Eosina	47
8.2.2. Coloración histoquímica de Tricrómica de Masson	47

RESUMEN

Las células de Paneth (CP) cumplen un rol muy importante en los mecanismos de defensa y protección del tracto intestinal en las diferentes especies de mamíferos, a través de sus secreciones como la lisozima, fosfolipasa A y defensinas. Es por este motivo que nuestro estudio tuvo por objetivo identificar la presencia y maduración de las células de Paneth en el intestino delgado de crías de cobayos de 0 a 15 días de edad, utilizándose para dichas determinaciones técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas (IHQ) en muestras de duodeno, yeyuno e íleon en cada animal, las cuales fueron fijadas en formol al 10% y procesadas como muestras histológicas. Las CP fueron observadas a partir de láminas coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E) y tricrómico de Masson. Además, mediante inmunohistoquímica se identificó la presencia de gránulos de lisozima para lo cual se utilizó un anticuerpo policlonal antilisosima. Mediante la coloración con H-E se pudo identificar las CP a partir del día 4 de edad, por tricrómico de Masson la observación de las CP fue a los 2 días de edad; mientras que, mediante el uso de la técnica de IHQ se pudo identificar las CP desde el momento del nacimiento (0 días de edad). Con respecto a la presencia del número de CP en las criptas de las diferentes porciones del intestino delgado se han obtenido valores en duodeno de 1.2 ± 0.63 a 3.6 ± 0.69 ; en yeyuno de 0.9 ± 0.56 a 3.0 ± 0.94 ; y e íleon de 0.6 ± 0.51 a 2.6 ± 0.69 , observándose diferencias estadísticas significativas entre los individuos de los 3 primeros días de edad (0-3 días de edad) con los animales de los tres últimos días de edad (13 a 15 días de edad) en todas las porciones intestinales. Concluyéndose que la técnica de IHQ permite identificar las CP desde los 0 días de edad y que la mayor presencia de CP fue en el duodeno en todas las edades.

Palabras Clave: Células de Paneth, cobayos, inmunohistoquímica, intestino delgado.

SUMMARY

Paneth cells (CP) play an important role in defense mechanisms and protection of the intestinal tract in different species of mammals, through their secretions, such as lysozyme, phospholipase A and defensins. Therefore, the aim of this study was to identify the presence and maturation of Paneth cells in the small intestine of young guinea pigs from 0 to 15 days old, using histochemical and immunohistochemical (IHC) techniques in samples of duodenum, jejunum and ileum in each animal, which were fixed in 10% formalin and processed as histologic specimens. The CP were observed from sheets stained with hematoxylin-Eosin (HE) and Masson trichrome. In addition, the presence of lysozyme granules was identified by immunohistochemistry, which used an antilysozyme polyclonal antibody. By HE stain, CP were identified from day 4 of age, and by Masson trichrome stain, they were identified at 2 days old; while using IHC technique, CP were identified from the moment of birth (0 days old). Regarding the CP number in the crypts of the different portions of the small intestine, the values in duodenum were 1.2 ± 0.63 to 3.6 ± 0.69 ; in jejunum 0.9 ± 0.56 to 3.0 ± 0.94 ; and in ileum $0.6 \pm 2.6 \pm 0.51$ to 0.69 ; statistical significant differences were found among individuals of the first 3 days of age (0-3 days old) compared with animals from the last three days of age (13 to 15 days old) in all intestinal portions. It was concluded that the IHC technique allows to identify the CP from 0 days of age whose presence was greater in the duodenum in all ages.

Keywords: Paneth cells, guinea pig, immunohistochemistry, small intestine.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Morfometría de las células de Paneth en el intestino delgado de cobayo.

Cuadro 2. Distribución promedio de células de Paneth por cripta intestinal de cada porción del intestino delgado en crías de cobayos de 0-15 días de edad.

Figura 1. Células de Paneth de cobayos

Figura 1.a. Células de Paneth en criptas de Lieberkühn de yeyuno de cría de cobayo de 15 días de edad, mediante H-E. 40X.

Figura 1.b. Células de Paneth en criptas de Lieberkühn de duodeno de cría de cobayo de 15 días de edad, mediante Tricromico de Masson. 40X.

Figura 1.c. Células de Paneth en criptas de Lieberkühn de yeyuno de cría de cobayo de 6 días de edad, mediante técnica de IHQ. 40X.

Figura 1.d. Células de Paneth en criptas de Lieberkühn de íleon de cría de cobayo de 6 días de edad, mediante técnica de IHQ. 40X.

I. INTRODUCCIÓN

El cobayo (*Cavia porcellus*), originario de la zona andina, está difundido y conocido mundialmente como “guinea pig”; en el Perú, es llamado cuy y es criado como animal de producción por sus características de prolificidad, precocidad, rusticidad y calidad de su carne (Aguilar et al., 2011).

Una de las etapas de mayor susceptibilidad del cobayo es la neonatal, especialmente durante la lactancia (0-15 días de edad), en la cual muchas enfermedades se presentan y pueden ocasionar la muerte del animal. Los animales que sobreviven tienen retraso en su crecimiento por deficiencia en la absorción de nutrientes a nivel intestinal. Estudios realizados en nuestro país en esta especie muestran una mortalidad del 59 % en la etapa neonatal, siendo los problemas entéricos los más recurrentes con un 72% (Cordero et al., 2001).

Los conocimientos acerca de la fisiología del tracto gastrointestinal del cobayo, en especial en la etapa de lactación, son escasos; sin embargo, se sabe que en la mayoría de mamíferos el tracto gastrointestinal constituye la principal superficie de intercambio y comunicación entre el medio externo y el medio interno; lo que conduce a una continua exposición de los animales a diversos agentes microbianos, los cuales pueden establecer un desbalance que conlleva a

alteraciones conocidas como enteropatías, de allí la necesidad de mantener la flora normal intestinal (Ouellette, 2005).

La defensa inmune innata en el intestino delgado está mediada, en parte, por células epiteliales localizadas en la base de las criptas de Lieberkühn, denominadas células de Paneth (CP), las cuales ejercen un papel en la defensa por medio de la secreción de lisozimas y péptidos con acción antimicrobiana (péptidos antimicrobianos) los cuales son importantes para el mantenimiento del equilibrio de la flora bacteriana normal en el intestino, además de proteger las células madre de las criptas “stem cells”, defender contra agentes patógenos ingeridos en el agua y alimentos y limitar en parte el número y composición de los agentes comensales (Bry et al., 1994).

Se han identificado CP en distintas especies (Rodning et al., 1982; Ehrmann et al., 1990; Lira, 2012). Sin embargo, dichos estudios son escasos en cobayos, en especial en edades tempranas (Sato et al., 1990; Tsumura et al., 1998). Por lo tanto, es necesario reportar la identificación y la morfología de este linaje celular en crías de cobayos por su importancia en la inmunidad innata. Esto permitirá mejorar la comprensión de la fisiología del intestino delgado de dichas crías.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cobayo: distribución e importancia

El hábitat del cuy es muy extenso, se han detectado numerosos grupos en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, noroeste de Argentina y norte de Chile, distribuidos a lo largo del eje de la cordillera andina, siendo Perú y Bolivia el hábitat nuclear del género *Cavia*. Este roedor vive por debajo de los 4 500 metros sobre el nivel del mar y ocupa regiones de la costa y la selva alta (Cabrera, 1953).

El hábitat del cuy silvestre, según la información zoológica, es todavía más extenso. Ha sido registrado desde América Central, el Caribe y las Antillas hasta el sur del Brasil, Uruguay y Paraguay en América del Sur. En Argentina se han reconocido tres especies que tienen como hábitat la región andina. La especie *Cavia aperea tschudii* se distribuye en los valles interandinos del Perú, Bolivia y noroeste de la Argentina; la *Cavia aperea aperea* tiene una distribución más amplia que va desde el sur del Brasil, Uruguay hasta el noroeste de la Argentina; y la *Cavia porcellus* o *Cavia cobaya*, que incluye la especie domesticada, también se presenta en diversas variedades en Guayana, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Pulgar Vidal, 1952; Cabrera, 1953).

En el Perú, la crianza familiar es la más difundida en la región andina. Se caracteriza por desarrollarse fundamentalmente sobre la base de insumos y mano de obra disponible en el hogar, manejándose de manera tradicional. En el departamento de Cajamarca, ubicado en la sierra norte del Perú, el 44,6 % de los productores crían cobayos exclusivamente para autoconsumo, y así disponer de una fuente proteica de origen animal; otros, cuando disponen de excedentes, los

comercializan para generar ingresos (49,6 %); pocos son los que crían los cuyes exclusivamente para la venta; en cuyo caso usan como insumos alimenticios malezas, residuos de cosechas y de cocina. El ambiente de crianza es normalmente la cocina, donde la fuente de calor del fogón protege a los animales de los fuertes cambios de temperatura. En otros casos, se construyen pequeñas instalaciones colindantes a las viviendas, aprovechando eficientemente los recursos disponibles en la finca. El número de animales está determinado básicamente por el recurso alimenticio disponible. El cuy criado bajo este sistema constituye una fuente alimenticia de bajo costo, siendo ocasionalmente utilizado como reserva económica para los momentos en que la familia requiere de liquidez (Zaldívar et al., 1990). La crianza del cuy se ha desarrollado en el país en las últimas décadas. Así, se ve un beneficio tanto del productor rural como del consumidor urbano, manteniéndose rentable (Chauca, 2013).

La mortalidad en la crianza de cuyes, por el desconocimiento de alternativas en el área de salud animal, limita el desarrollo de su producción. A causa de problemas sanitarios se tiene la mayor merma de la producción. Los cuyes pueden padecer enfermedades bacterianas, virales, parasitarias y orgánicas. Entre las causas que predisponen a las enfermedades están los cambios bruscos en su medio ambiente, desde temperatura, alta humedad, exposición directa a corrientes de aire, hasta falta de higiene y alimentación (Chauca, 1997).

Los estudios e informaciones sobre la sanidad del cuy demuestran su gran susceptibilidad a la salmonelosis; siendo esta la enfermedad más grave que los afecta. Presenta un cuadro clínico de mortalidad severa y aparición de abortos, pérdida de apetito, anemia, erizamiento del pelaje, jadeo, diarrea y parálisis de los miembros posteriores, siendo los cuyes lactantes los más susceptibles, bastando únicamente un estrés para activar la *Salmonella* que se encuentra en estado latente, originando hasta el 95% de muertes de la morbilidad general por diversas causas. Dependiendo de la edad, los cuyes manifiestan diversos grados de susceptibilidad a la salmonelosis; los animales en lactancia expresan mayor tasa de morbilidad, registrando valores hasta de 52,70%, los adultos hasta 30,65% y los de recría 19,83% (Ramírez, 1974; Leguía, 1993).

La salmonelosis es ocasionada por serotipos del género *Salmonella*, 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 (Ramírez, 1972).

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 (Chauca, 1997).

2.2. Fisiología gastrointestinal del cobayo

El cuy es una especie herbívora monogástrica, tiene un estómago donde inicia su digestión enzimática y un ciego funcional donde se realiza la fermentación bacteriana; su mayor o menor actividad depende de la composición de la ración. Realiza cecotrofia para reutilizar el nitrógeno, lo que permite un buen comportamiento productivo con raciones de niveles bajos o medios de proteína. El cuy está clasificado según su anatomía gastrointestinal como fermentador post-gástrico 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 (Reid y Mickelsen, 1963; Gómez y Vergara, 1993). 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 (Gómez y Vergara, 1993).

La flora bacteriana existente en el ciego permite un buen aprovechamiento de la fibra (Reid y Mickelsen, 1963; Gómez y Vergara, 1993). 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 (Holstenius y Bjornhag, 1985; Caballero, 1992).

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 (Gómez y Vergara, 1993).

2.3. 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 (Ross y Pawlina, 2007, Geneser, 2009; Junqueira y Carneiro, 2006).

a. 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. (Junqueira y Carneiro, 2006).

b. 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 (Ross y Pawlina, 2007; Geneser, 2009).

c. 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 distribuidas en sentido longitudinal. Entre estas dos capas musculares están situados los componentes principales del plexo mientérico 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 (Ross y Pawlina, 2007; Geneser, 2009).

d. 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 (Ross y Pawlina, 2007).

2.3.1. 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 supeditada 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 (Ganz y Lehrer, 1998).

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 (Cheng y Leblond, 1974; Potten y Loeffler, 1990; Ouellette et al., 2003).

La diferenciación de estas células está relacionada a una interacción dinámica recíproca entre las células epiteliales y las mesenquimales que son necesarias para eventos morfogenéticos 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 (CP) las que juegan un rol importante en el mantenimiento de esta homeostasis y en la activación de la respuesta innata a los microorganismos (Garabedian et al., 1997).

Las CP están localizadas en la base de las criptas de Lieberkühn y están distribuidas desde el duodeno hasta el ileon (Porter et al., 2002). Estudios en ratones y humanos muestran que las CP migran hacia la parte inferior de la zona de células madres pluripotenciales “stem cells”, 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 (Bry et al., 1994; Cheng, 1974). Histológicamente, las CP se desarrollan en condiciones libres de gérmenes y de xenoinjertos tanto en intestino de ratones como de humanos, lo que demuestra que el desarrollo estructural de células de Paneth no requiere de bacterias luminales ni de componentes de la dieta (Rubin et al., 1992).

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 CP 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 (Kamal et al., 2001).

2.4. Células de Paneth

Las CP 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 (Ouellette et al., 2000). El contenido de los gránulos de las CP 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 (Porter et al., 2002; Bevins, 2004; Ouellette, 2005). Los gránulos secretorios de las CP contienen lisozimas, α -defensinas y fosfolipasa A2 secretora (Hecht, 1999, Hornef et al., 2004).

Los análisis en profundidad sobre las CP han sido proporcionados por sus productos genéticos. Por ejemplo, la secreción de la lisozima y homólogos de péptidos antimicrobianos fagocíticos indican que las CP 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 CP como son la fosfolipasa A2 de secreción (sPLA2) y α -defensinas. En los ratones, estos productos genéticos que aparecen durante la ontogenia de la cripta después del parto, coincide con la diferenciación de las CP y son marcadores útiles de la estirpe celular entérica. La secreción de este conjunto de péptidos antimicrobianos de las CP, en particular las defensinas, están involucradas en la función inmune innata (Ouellette y Selsted, 1996).

Cada cripta contiene de 3 a 5 CP 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 (Cheng, 1974; Troughton y Trier 1969). La edad de las CP 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 (Bjerknes y Cheng, 1981). 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 (Cheng, 1974; Bjerknes y Cheng, 1981).

2.5. 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, la 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 (CP). 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 CP 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 CP a lo largo del intestino, así como en células tumorales del epitelio (Blache et al., 2004). 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 (Spokony et al., 2002), en las células madre neurales permite pasar de la neurogénesis a gliogénesis (Stolt et al., 2003) y el desarrollo en el corazón (Akiyama et al., 2004a), el pelo (Vidal et al., 2005), y páncreas (Seymour et al., 2007). 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 (Blache et al., 2004). Datos in vitro e 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 del gen de Sox9 en el epitelio intestinal da como resultado una completa ausencia de las CP, de lo que se infiere que estas proteínas son específicas y necesarias para la diferenciación de las CP (Bastide et al., 2007; Mori-Akiyama et al., 2007).

La posición de las CP en la base de la cripta depende de la expresión del EphB3, que es un receptor de membrana que está altamente expresado en las CP 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 CP (Batlle et al., 2002).

2.6. Secreción de las células de Paneth

2.6.1. Lisozimas

Las lisozimas son proteínas antibacteriales que se encuentran en concentraciones significativas en muchas secreciones humanas incluyendo las lágrimas, secreciones gástricas e intestinales, siendo importantes en las CP en el intestino delgado (Klockars y Reitamo, 1975). 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 CP (Coutinho et al., 1998).

2.6.2. Fosfolipasa A2 secretoria

La fosfolipasa A2 secretora (PLA2s) es un componente de los gránulos de las CP 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 (Harwig et al., 1995).

2.6.3. 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 (Nissen-Meyer y Nes, 1997). 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 respiratoria, 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 (Selsted y Ouellette, 1995).

Las α -defensinas de origen murino fueron las primeras descritas en las CP (Cunliffe y Mahida, 2004) 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 (Ayabe et al., 2000). Los ratones tienen varios tipos de criptidinas y secuencias relacionadas a criptidinas (CRS) que son péptidos expresados en las CP (Huttner y Ouellette 1994; Ouellette y Selsted, 1996). La mayoría de las criptidinas de ratón pertenecen a las criptidinas del Grupo 1, siendo las excepciones las criptidinas 4 y 5 (Ouellette y Selsted, 1996). La regulación celular específica de las α -defensinas de las CP ha sido desentrañada con la reciente identificación de los factores de transcripción TCF-4, los cuales son proteínas claves en el proceso de identificación (Andreu et al., 2005; Van Es et al., 2005). De los antimicrobiales las defensinas son las más abundantes en roedores y humanos. En humanos las CP expresan dos α -defensinas: HD-5 y HD-6 (Jones y Bevins, 1992).

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 (Ouellette y Lualdi 1990; Lin et al., 1992; Huttner y Ouellette, 1994), pero las acciones del péptido procesado no se asemeja a las acciones de las criptidinas. Los péptidos CRS se dividen en dos grupos; CRS1C contiene 11 cisteínas y CRS4C con 9 cisteínas (Ouellette y Lualdi 1990; Hornef et al., 2004). 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 homómeros y heterodímeros, que solapan las actividades de los antimicrobianos (Hornef et al., 2004).

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 CP son el procesamiento proteolítico y secreción de gránulos (Ayabe et al., 2000). Un paso importante en la expresión de las α -defensinas en las CP 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 CP, cuya actividad es esencial para la producción de péptidos de criptidina activos ya que rompe el propéptido de modo que la degranulación de la CP libera la defensina activa dentro del lumen de la cripta (Wilson et al., 1999). Caso contrario, en las CP 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 (Ghosh

et al., 2002), 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 están definidos.

La secreción de los gránulos de péptidos antimicrobianos por parte de CP 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 (Ayabe et al., 2000), 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 CP, siendo este mecanismo no del todo conocido (Sawada et al., 1991; Kamal et al., 2001;).

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 (Gavrieli et al., 1992). 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 (Meister, et al., 1997).

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 (Zasloff, 1992). En insectos como el *Stomoxys calcitrans* la producción de defensinas del intestino se activan tras el consumo de sangre (Dimopoulos et al., 1997; Russell y Dunn 1996) 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 (Russell y Dunn 1996).

2.7. 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 (Bevins, 2006).

Los mecanismos de inmunidad innata que protegen la mucosa intestinal comprende 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 (Bevins, 2006). El elemento celular incluye células epiteliales, mastocitos, células dendríticas, células fagocíticas como macrófagos y granulocitos, células natural killer y células T (Elphick y Mahida, 2005).

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 (Elphick y Mahida, 2005).

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

La importancia de los péptidos antimicrobianos del intestino delgado se ha destacado tanto en ratones como en humanos. Estudios en la enfermedad de Crohn demostraron que la reducción de las α -defensinas de las CP está implicado como un contribuyente clave para la disfunción inmune innata con cuadros de ileitis (Wehkamp et al., 2005). Además, se ha demostrado que ratones manipulados para presentar deficiencia de criptidinas son más sensibles a la infección oral por *Salmonella* entérica serovar typhimurium (Wilson et al., 1999), mientras que los ratones transgénicos con expresiones adicionales para α -defensinas de humano (a nivel de las CP) son más resistentes a Salmonelosis (Salzman et al., 2003). Estos resultados apoyan la hipótesis de que las defensinas de las CP son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata en el tracto intestinal. Entonces se está demostrando que las CP 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 CP 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 CP fueron influenciados por la colonización bacteriana (Darmoul y Ouellette, 1996; Patil et al., 2004).

Estudios experimentales establecieron que el número de CP en el intestino delgado se incrementa como consecuencia del aumento en la carga bacteriana luminal y al examen patológico demostraron que las CP que están ordinariamente

confinadas en el intestino delgado y las partes más proximales del intestino grueso, y que se pueden encontrar a lo largo del intestino grueso inflamado (Keren et al., 1975; Lewin, 1969).

Estudios histoquímicos y morfológicos han demostrado la presencia de CP en algunas especies como en ratas (Rodning et al., 1982), humanos (Ehrmann et al., 1990), ardilla (Toth, 1980) y caballo (Takehana et al., 1998). En rumiantes ha sido determinada la presencia de CP en el intestino delgado de la oveja (Ergün et al., 2003), así como en la alpaca (Lira, 2012). Aunque existen reportes en cobayos, dichos estudios son escasos, especialmente en edades tempranas (Sato et al., 1990; Tsumura et al., 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM, San Borja - Lima, a 150 metros de altitud, presión barométrica de 750 mmHg y presión parcial de oxígeno de 157 mmHg.

3.2. Animales

Se criaron cobayos hembras gestantes de la Línea 1 La Molina, estandarizando el suministro de alimento concentrado más alimento verde (alfalfa y chala). Los animales al nacimiento fueron seleccionados según las edades (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días de edad , usando un total de 48 animales (3 por edad).

3.3. Materiales

3.3.1. Material para la recolección de muestras

- Frascos de plásticos con tapa rosca de 50mL de capacidad.
- Formol buferado al 10%.
- Hojas de afeitar.
- Estuche de disección.
- Masking tape de 2".

- Cuchillo.
- Jeringas descartables de 20mL.
- Gasa.
- Algodón.
- Costótomo.
- Pentobarbital al 6,5% (Halatal).
- Caja de tecnopor.

3.3.2. Equipos y materiales para el procesamiento de muestras de histología e inmunohistoquímica

3.3.2.1. Sustancias, reactivos y colorantes:

- Xilol.
- Alcohol de 70º, 80º, 90º, 96º y 100º.
- Parafina.
- Agua destilada con un pH de 7,1.
- Metanol.
- Peróxido de hidrógeno.
- Solución salina buffer fosfato (PBS).
- Solución buffer citrato pH 6.
- Albúmina suero bovina (BSA) al 1% y al 0.1% (Santa Cruz Biotechnology, USA).
- Hematoxilina.
- Eosina.
- Tricrómico de Masson.
- Anticuerpo policlonal de conejo conjugado con biotina (fracción IgG) a lisozima humana (Accurate Chemical & Scientific Corporation, USA).
- R.T.U. Horseradish Peroxidasa Streptavidin (Vector Laboratories, Inc, USA).
- 3,3´Diaminobenzidina (DAB)

3.3.2.2. Equipos de laboratorio:

- Estufa.
- Equipo de procesamiento de muestras.

- Horno microondas.
- Micrótopo.
- Copas de coloración.
- Cubetas de coloración de plástico y vidrio.
- Moldes de parafinas.
- Láminas cubreobjetos y portaobjetos.
- Microscopio con luz incorporada (Primo Star, Carl Zeiss, Alemania).
- Cámara fotográfica digital de 10 megapixels (Canon, Japón)
- Computadora Corel 2 Duo
- Programa de mediciones para Canon AxioVision

3.4. **Metodología**

3.4.1. **Sacrificio de los animales**

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico al 6,5%, la aplicación del anestésico se realizó por punción intracardiaca previa inmovilización del animal. Siempre se realizó este procedimiento a las 8 de la mañana.

3.4.2. **Necropsia de los animales**

Una vez sacrificado el animal, se le colocó en posición de cúbito dorsal y se realizó un corte a nivel de la línea media del abdomen desde la región xifoidea hacia la parte anterior del pubis. Se seccionó la pared abdominal mediante dos cortes transversales de la región umbilical hacia el lado derecho e izquierdo respectivamente entre el arco costal y la protuberancia pélvica y se removió el intestino delgado para su extracción.

3.4.3. **Toma de muestras intestinales para histología e inmunohistoquímica**

Se tomaron muestras de 2 cm aproximadamente de la porción media de duodeno, yeyuno e íleon, las cuales fueron colocadas en frascos de plástico con formalina buferada al 10% para su fijación, dejándose reposar por aproximadamente 48 horas.

3.5. **Procesamiento de muestras intestinales para histología**

Las muestras fijadas, fueron reducidas con cortes transversales de la porción intestinal en porciones de aproximadamente 0.5 cm, las cuales fueron procesadas mediante técnica estándar de procesamiento de muestras, para luego ser incluidas en parafina (AFIP, 1995).

Se realizaron cortes los cuales fueron colocados en láminas y fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson.

3.6. **Detección de lisozima mediante inmunohistoquímica**

Se prepararon cortes de 6 μm de espesor que fueron colocados en láminas portaobjetos previamente enbebidas con Poly-L-Lysina, procediendo a realizar el desparafinado correspondiente y la marcación de células productoras de lisozima mediante inmunohistoquímica para lo cual se utilizó el siguiente protocolo (Zanuzzi, 2010):

- 10 minutos en xilol (desparafinado).
- 10 minutos en xilol (desparafinado).
- 05 minutos en alcohol de 100° (hidratación).
- 30 minutos en metanol (200mL) + peróxido de hidrógeno (4mL) (Inactivación de la peroxidasa endógena).
- 05 minutos en alcohol de 100° (hidratación).
- 05 minutos en alcohol de 96° (hidratación).
- 05 minutos en alcohol de 96° (hidratación).
- 05 minutos en alcohol de 80° (hidratación).
- 05 minutos en alcohol de 70° (hidratación).
- 03 minutos lavado en PBS (2 veces).
- Recuperación antigénica: 10 minutos con solución buffer citrato pH 6 en microondas a 750W.
- 05 minutos lavado en PBS (3 veces).
- Inactivación de uniones inespecíficas: 30 minutos con BSA al 1%.
- Incubación con anticuerpo primario a 4°C durante 24 horas.
- 03 minutos enjuague en PBS (3 veces).
- Incubación R.T.U. Horseradish Streptavidin Peroxidasa: 30 minutos.

- 05 minutos lavado en PBS (3 veces).
- Revelado cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB).
- Lavado en agua corriente y luego lavado en agua destilada por 5 minutos.
- Coloración de contraste: Hematoxilina de Harris.
- Pasaje por alcoholes (deshidratación) 70º - 80º - 96º - 96º- 100º - 100º (durante 5 minutos cada uno) y xilol 1 y Xilol 2(10 minutos cada uno).
- Montaje.

3.7. **Lectura de Láminas**

En las láminas preparadas con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson se realizó la descripción de las células de Paneth y se ubicó la posición en las criptas por histología. En las láminas preparadas con inmunohistoquímica se realizó el conteo del número de células de Paneth en 10 criptas de Lieberkühn por cada porción de intestino de cada animal.

3.8. **Análisis de Datos**

Los datos encontrados fueron colocados en tablas y analizados con la prueba de ANOVA para buscar la diferencia entre edades y porciones intestinales.

IV. RESULTADOS

a. Morfometría de las Células de Paneth:

Las CP encontradas en las crías desde recién nacidos hasta los 15 días de edad, presentan un eje mayor de 21.84 ± 3.91 , eje menor de 11.75 ± 2.33 y área de 232.50 ± 61.60 (Cuadro 1).

Cuadro N° 1. Morfometría de las células de Paneth en el intestino delgado de cobayos (expresado en μm)

Eje Mayor		Eje Menor		Área	
Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
21.84	3.91	11.75	2.33	232.50	61.60

b. Número de Células de Paneth:

El número de células de Paneth presentes en las criptas de Lieberkühn de las diferentes porciones intestinales fue mayor en duodeno, luego en yeyuno y en menor cantidad en íleon. Además, hubo una relación directa entre el número de células y la edad del animal, encontrándose diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los primeros días de edad y los últimos días de edad. En el duodeno se encontró diferencias entre los días 0, 1, 2 y los 13, 14, 15; además entre el día 3 y 15. En el yeyuno estas diferencias fueron entre los días 0, 1, 2, 3 y 13, 14, 15; además entre los días 4 y 15. Finalmente, a nivel del íleon estas diferencias se dieron entre los días 0, 1 y 14, 15; además entre 2 y 15 días (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución promedio de células de Paneth por cripta intestinal de cada porción del intestino delgado en crías de cobayos de 0-15 días de edad

Porción intestinal	Edad (días)																															
	RN		1		2		3		4		5		7		9		11		13		15											
	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS										
Duodeno	1.00 ⁰¹ ±0.32	1.00 ⁰¹ ±0.47	1.17 ^{01b1} ±0.65	2.00 ^{01d1} ±0.56	2.23 ^{01d1} ±0.68	1.70 ^{01c1} ±0.65	2.13 ^{01d1} ±0.65	2.34 ^{01d1} ±0.63	2.18 ^{01d1} ±0.77	3.30 ^{01d1} ±0.70	3.20 ^{01d1} ±0.84	0.40 ⁰² ±0.50	0.70 ⁰¹ ±0.48	1.40 ⁰² ±0.59	1.57 ^{02c2} ±0.57	1.35 ^{01b1} ±0.49	1.58 ^{02c2} ±0.56	2.14 ^{01c1} ±0.67	2.90 ⁰² ±0.74	2.83 ⁰² ±0.83	2.84 ⁰² ±0.65	0.65 ⁰² ±0.49	0.90 ^{01b1} ±0.74	1.00 ^{01b1} ±0.67	1.45 ^{02c2} ±0.61	1.70 ^{02d2} ±0.65	1.35 ^{01c1} ±0.49	1.75 ^{02d2} ±0.63	2.26 ^{01d1} ±0.60	1.92 ^{02d1} ±0.60	1.73 ^{02d3} ±0.68	1.90 ^{02d3} ±0.71

a,b,c,d,e: letras diferentes indican diferencia estadística ($p<0.05$) entre los promedios de las diferentes edades dentro de cada porción de intestino delgado (filas).

1,2,3: números diferentes indican diferencia estadística ($p<0.05$) entre los promedios de las diferentes porciones de intestino delgado en cada edad (columnas).

c. Características de Células de Paneth según la técnica::

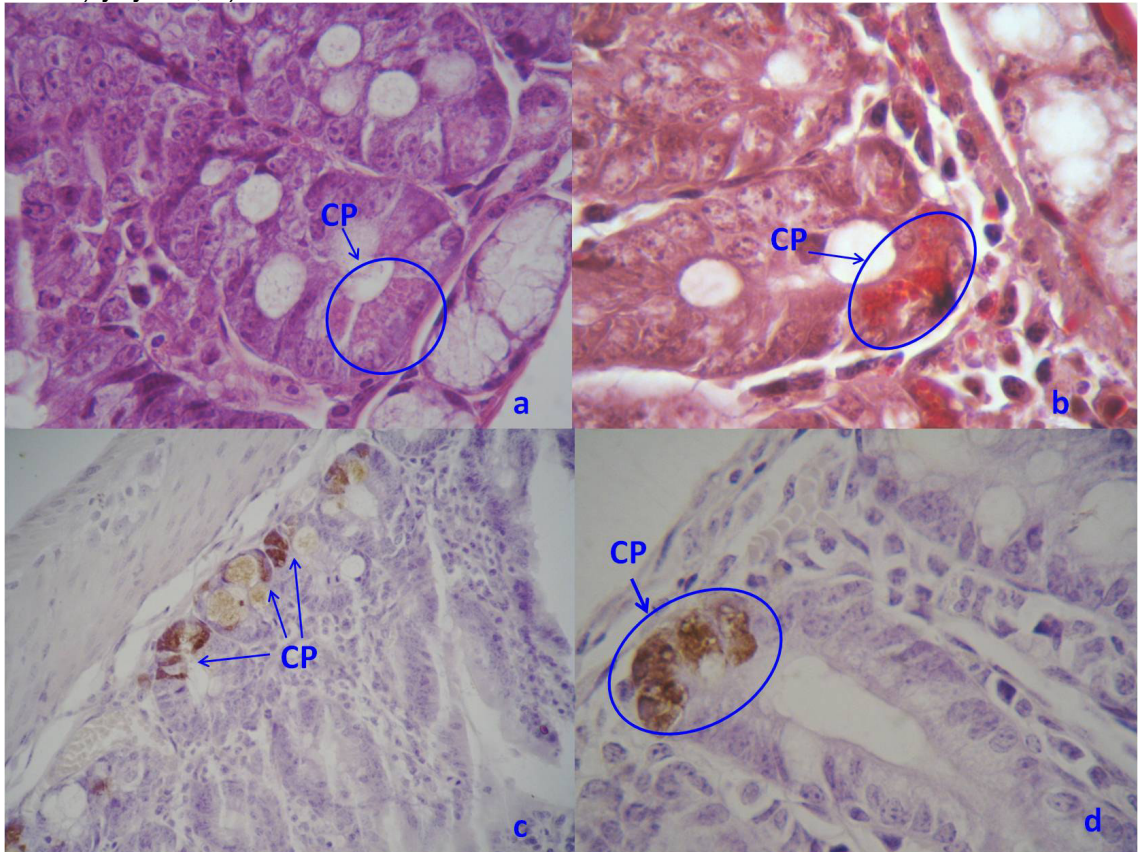
En láminas coloreadas con Hematoxilina –Eosina, en las 3 porciones intestinales, se pudo identificar células de Paneth a partir de los 4 días de edad, mientras que con Tricrómico de Masson se pudo identificar con mayor facilidad a los 2 días de edad y mediante inmunohistoquímica estas células se pudieron observar desde el nacimiento (Figura 1).

Mediante la coloración de Hematoxilina–Eosina se observó células con un citoplasma basófilo y gránulos en el citoplasma con una reacción eosinofílica intensa que corresponde a las lisozimas antimicrobianas contenidas en la célula. Estas células se observaron en la base de las criptas de Lieberkühn y fueron de forma piramidal.

Mediante Tricrómico de Masson se observó células con citoplasma ligeramente eosinofílico y gránulos con reacción eosinofílica intensa, que corresponde a las lisozimas antimicrobianas de las células de Paneth, la ubicación de las células fue en la base de las criptas.

Mediante inmunohistoquímica (IHQ) se ubicaron CP en la base de las criptas de Lieberkühn en las 3 porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), las cuales contenían gránulos de secreción de lisozima a partir de cero días de edad (nacimiento). Los gránulos de lisozima se observaron de color marrón dorado diferenciándose de otras células cuyo citoplasma fue de color rosado tenue. La forma de las células de Paneth en esta especie es piramidal con núcleo hacia la base y gránulos en el citoplasma.

Figura N° 1. Células de Paneth de cobayos. a) Duodeno, cobayo de 15 días, coloración Hematoxilina-Eosina; b) Duodeno, cobayo de 15 días, Tricrómico de Masson; c y d) identificación de Lisozima mediante inmunohistoquímica, cobayo de 6 días c) yeyuno, d) íleon.



V. DISCUSIÓN

En los cobayos lactantes del presente estudio se determinó una mayor densidad de células de Paneth a nivel de duodeno, en segundo lugar el yeyuno y la porción con menor densidad fue el íleon, de manera similar en un estudio en ratas determinó un mayor número de células de Paneth del duodeno hacia el íleon. Por su parte, Cheng (1969) cuantificó en el intestino delgado de ratones una mayor densidad de células de Paneth del duodeno al yeyuno, pero en el íleon hubo una menor densidad que en duodeno. Estudios realizados en otras especies han sido realizados principalmente en individuos adultos, es así que Ergün et al (2003) evidenció en la oveja también una distribución heterogénea de estas células a lo largo del intestino delgado, con una alta densidad en el yeyuno y una baja densidad de células de Paneth en el duodeno e íleon.

Una forma de examinar la función de células de Paneth es estudiar la diferenciación de los linajes celulares durante el desarrollo del intestino el cual va acorde con su edad. En crías de cobayos de 0 a 15 días de edad la medición indirecta de la funcionalidad de las células de Paneth se puede determinar por la presencia del número de éstas en las diferentes porciones intestinales. En este estudio el promedio del número de células de Paneth por cripta intestinal encontrado fue en duodeno de 1.2 a 3.6, en yeyuno de 0.9 a 3.0 y en íleon de 0.6 a 2.6, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los valores extremos (primeros y últimos días de edad de los animales del estudio) dentro de cada porción intestinal, pues está demostrado que entre la segunda y tercera semana postnatal en roedores (8 a 21 días de edad), como las ratas y ratones, las células de Paneth sufren un incremento significativo en su número (Bry et al., 1994). Los análisis con técnicas como inmunofluorescencia y RT-PCR muestran que el intestino del ratón perinatal contiene un epitelio con intervalos policlonales (baja diferenciación celular específica), suministrado por las células madre con múltiples genotipos (Schmidt et al., 1988). Sin embargo, un proceso de selección celular se produce durante la morfogénesis de la cripta, dando criptas monoclonales por el día 14 postnatal, momento en el cual se puede observar una mayor densidad de células de Paneth en el intestino delgado (Loeffler et al., 1993). Además trabajos como los de Ergün et al (2003) encontraron en yeyuno de ovejas un promedio de células de Paneth de 2.49, mientras que Zanuzzi et al (2008) encontró valores superiores en yeyuno de conejos controles de 3 meses de edad siendo 4.28 células de Paneth por cripta intestinal; sin embargo,

estos valores son menores a lo encontrado por Cheng y Leblond (1974) quienes encontraron en ratones un rango de 5 a 12 células de Paneth por cripta.

VI. CONCLUSIONES

La técnica de inmunohistoquímica permite, con precisión, la identificación de las células de Paneth desde el nacimiento (0 días de edad), a diferencia de las técnicas de Hematoxilina–Eosina y tricrómico de Masson que permitieron la identificación con cierta dificultad a los 2 y 4 días de edad, respectivamente.

La mayor presencia de células de Paneth fue a nivel del duodeno, y en menor cantidad en el íleon, en todas las edades.

El número de células de Paneth en las tres porciones del intestino delgado mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los primeros (0-3 días) y últimos (13-15 días) días de edad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Magied E, Taha AAM. 1995. A comparison of the structure of granular cell type in the epithelium of the camel with Paneth cells of the rabbit. *Journal of the King Saud University* 7, Science (1), pp. 51-62.
2. **AFIP**: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. 1995. *Métodos Histotecnológicos*. Washington, DC: Publicado por el Registro de Patología de los Estados Unidos de América. 276 p.
3. Akiyama H, Chaboissier R, Behringer D, Rowitch A, Schedl J, Epstein, Crombrugge G. 2004a. Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:6502–6507.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. Behnke O, Moe H. 1964. An electron microscope study of mature and differentiating Paneth cells in the rat, especially of their endoplasmic reticulum and lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 22, 633-652.
9. Bevins C. 2004. Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol*. 20:572-580.
10. Bevins C. 2006. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochemical Society Transactions* 34 parte 2.
11. Bjerknes M, Cheng H. 1981. The stem cell zone of the mouse small intestinal epithelium. 1. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am. J. Anat*; 160, 51-64.
12. 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.
13. Bry L, Falk P, Huttner K. 1994. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:10335–10339.
14. Caballero A. 1992. Valor nutricional de la panca de maíz: consumo voluntario y digestibilidad en el cuy (*Cavia porcellus*). UNA La Molina, Lima, Perú. (Tesis.)
15. Cabrera A. 1953. *Los roedores argentinos de la familia Caviidae*. Publicación 6:48-56. Universidad de Buenos Aires.
16. Chauca L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*) en los países andinos. *Revista mundial de zootecnia* 83. FAO. [Internet], [12 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/v6200t/v6200T05.htm>
17. Chauca L. 2013. "Crianza del cuy *Cavia porcellus* y su impacto en el desarrollo rural. En: XXXVIII Reunión de la Asociación Peruana de Producción Animal APPA. Ayacucho. INIA – DIA - PNIAM – Proyecto Cuyes. [Internet], [11 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/images/AccDirectos/publicaciones/cuyes/doc/2013%20APP A.pdf>
18. Cheng H. 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells. *Am J Anat* 141:521-535.
19. 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.
20. Cordero R, Cevallos C, Cueva R, Arnaiz V. 2001. Evaluación de mortalidad de cuyes (*cavia porcellus*) en época de verano. *Rev. Inv. Vet. Peru*, suplemento. 1: 416-417.

21. Coutinho H, Carmona da Mota H, Coutinho V. 1998. Absence of lysozyme (muramidase) in the intestinal Paneth cells of newborn infants with necrotizing enterocolitis. *J Clin Pathol.* 51:512–14.
22. Cunliffe R, Mahida Y. 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol.* 75:49-58.
23. 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.
24. 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.
25. Ehrmann J, Malinsky J, Gregar I. 1990. Paneth cells and coeliac disease-quantitative, morphometric analysis. *Acta Univ Palacki Olomic Fac Med.* 126:187-201.
26. Elphick D, Mahida R. 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut.* 54:1802-1809.
27. Ergün E, Ergün L, Asti R, Kürüm A. 2003. Light and electron microscopic morphology of Paneth cells in the sheep small intestine. *Rev Med Vet.* 154:351-5.
28. Garabedian EM, Roberts J, Mc Nevin MS, et al. 1997. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272:23729–23740.
29. Ganz T, y Lehrer R. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* 10:41-44.
30. 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.
31. 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.
32. Girardin S, Boneca I, Viala J. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 278:8869-8872.
33. Gómez B, Vergara V. 1993. *Fundamentos de nutrición y alimentación*. I Curso nacional de capacitación en crianzas familiares. págs. 38-50, INIA-EELM-EEBI.
34. Hall P, Coates P, Ansari B, Hopwood D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.* 107:3569–3577.

35. Harwig S, Tan L, Qu X. 1995. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *J Clin Invest.* 95:603-610.
36. Hecht G. 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol.* 277: C351-358.
37. Holtenius K, Bjornhag G. 1985. The colonic separation mechanism in the guinea pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Comparative biochemistry and Physiology* 824(3):537-542.
38. Hornef M, Putsep K, Karlsson J, Refai E, Andersson M. 2004. Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation. *Nat Immunol.* 5:836–843.
39. 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.
40. Jones D, Bevins C. 1999 Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem.* 267:23216-23225.
41. 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.
42. 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.
43. Klockars M, Reitamo S. 1975. Tissue distribution of lysozyme in man. *J Histochem Cytochem.* 23:932–940.
44. Leguia P. 1993. *Enfermedades infecciosas y parasitarias de cuyes*. I Curso regional de producción de cuyes, INIA-EELM-EEBI.
45. Lewin K. 1969. The Paneth cell in disease *Gut.* 10:804–811.
46. 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.
47. Lira B, Cueva S, Rodríguez J, et al. 2012. Identificación de las Células de Paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad. *Rev Inv Vet Perú* 23:138–146.
48. Loeffler M., Birke A, Winton D, Potten C. 1993. *Theor. Biol.* 160, 471-491.
49. Meister M. Lemaitre, Hoffmann J. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays.* 19: 1019-1026.

50. 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.
51. Nissen-Meyer J, Nes I. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167:67-77.
52. Ouellette A, Luaidi 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.
53. Ouellette A, Selsted M. 1996. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *Am J Physiol* 10:1280-1289.
54. 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.
55. 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.
56. Ouellette A. 2005. Paneth cell α defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol.* 27:33-146.
57. 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.
58. Porter E, Bevins C, Ghosh D, Ganz T. 2002. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 59(1):156–170.
59. Potten C, Loeffler M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons from the crypt. *Development.* 110:1001-1020.
60. Pulgar Vidal J. 1952. *El curí o cuy*. Ministerio de Agricultura, Bogotá, Colombia.
61. Putsep K, Axelsson LG, Boman A, Midtvedt T, Normark S, Boman HG, Andersson M. 2000. Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. *J. Biol. Chem.* 275, 40478–40482.
62. Ramírez V. 1972. *Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos*. UNMSM, Lima, Perú. (Tesis).
63. Ramírez, V. 1974. *Salmonellosis en cobayos (Cavia porcellus), aspectos epidemiológicos*. 11 CONIAP, Lima, Perú.

64. Reíd M, Mickelsen O. 1963. Nutritional studies with the guinea pig: VIII. Effect of different proteins, with and without amino acid supplements, on growth. *J. of Nutrition* 80:25-32.
65. 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.
66. Ross M, Pawlina W. 2007. *Histología, Texto y atlas color con Biología celular y molecular.* Panamericana. 5° Ed. pag 610-618.
67. 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.
68. Russell V, Dunn P. 1996. Antibacterial proteins in the midgut of *Manduca sexta* during metamorphosis. *J. Infect.* 42: 65-71.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Selsted M, Ouellette A. 1995. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol.* 5:114-119.
73. Schmidt G, Winton D, Ponder. 1988 *Development* (Cambridge, U.K.) 103, 785-790.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.

78. Toth D. 1980. Ultrastructural changes in Paneth cells during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. *Cell Tissue Res* 1980; 211:293-301.
79. Troughton W, Trier J. 1969. Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. *J. Cell Biol.* 41:251–268.
80. Van der Flier L, Clevers H. 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71:241–60
81. Van Es J, Jay P, Gregorieff A, van Gijn M, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, Born M, Begthel H, Brabletz T. 2005. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol.* 7:381-6.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. Zaldívar A. 1990. *Informe final Proyecto Sistemas de producción de cuyes en el Perú FASE 1.* INIA-CIID. 96 págs.
86. Zanuzzi C, Fontana P, Barbeito C, Portiansky E, Gimeno E. 2008. Paneth cells: histochemical and morphometric study in control and *Solanum glaucophyllum* intoxicated rabbits. *European Journal of Histochemistry.* vol. 52 issue 2 (Apr-Jun): 93-100.
87. Zanuzzi C. 2010. Efectos de la intoxicación con *Solanum glaucophyllum* (duraznillo blanco) sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular en el intestino de conejos. Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Plata, Argentina: Fac Cien Vet, Univ Nac de la Plata. 286 p.
88. Zasloff M. 1992. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 4:3-7.

VIII. ANEXOS

8.1. Procesamiento de muestras intestinales para histología e inmunohistoquímica

Las muestras fueron reducidas con ayuda de hojas de afeitar a un tamaño aproximado de 0,5 cm de largo por 0,5cm de ancho por 0,5cm de espesor, las cuales fueron colocadas en moldes de parafina debidamente identificados y se procedió al lavado con agua corriente durante 6 horas, luego de lo cual fueron colocados en el equipo de procesamiento de muestras que fue programado como sigue:

- 01 hora en alcohol de 80º
- 30 minutos en alcohol de 90º
- 30 minutos en alcohol de 96º (I)
- 30 minutos en alcohol de 96º (II)
- 30 minutos en alcohol de 100º (I)
- 30 minutos en alcohol de 100º (II)
- 30 minutos en alcohol de 100º (III)
- 01 hora en xilol (I)
- 30 minutos en xilol (II)
- 30 minutos en xilol (III)
- 01 hora en parafina (I)
- 30 minutos en parafina (II)

Una vez terminado el proceso se procedió a retirar las muestras del equipo de procesamiento y se incluyeron en parafina. Las muestras incluidas se dejaron reposar por 24 horas luego de lo cual se procedió al corte con un grosor de 6µm y colocadas en láminas portaobjetos.

8.2. Coloración de las láminas para histología

Una vez obtenidas los cortes histológicos con un grosor de 6µm y colocadas en láminas portaobjetos se procedió de la siguiente manera:

8.2.1. Coloración histológica de Hematoxilina-Eosina

- 15 minutos en Xilol (desparafinado).
- 03 minutos en alcohol de 100º (hidratación).
- 03 minutos en alcohol de 96º (hidratación).
- 03 minutos en alcohol de 70º (hidratación).
- 03 minutos en agua destilada (lavado).
- 10 a 15 minutos en Hematoxilina de Mayer (tinción).
- lavar bajo flujo de agua corriente hasta azulear.
- 02 a 04 minutos con eosina al 1% (tinción)
- Eliminar los restos de eosina en etanol 70º.
- 03 minutos en alcohol de 96º (deshidratación).
- 03 minutos en alcohol de 100º (deshidratación).
- 03 minutos de aclarado con xilol.
- Montaje.
- Dejar secar los portaobjetos en la estufa de 37ºC.

8.2.2. Coloración histoquímica de Tricrómica de Masson

- 15 minutos en Xilol (desparafinado).
- 03 minutos en alcohol de 100º (hidratación).
- 03 minutos en alcohol de 96º (hidratación).
- 03 minutos en alcohol de 70º (hidratación).
- 05 minutos en agua destilada (lavado).
- 10 minutos en hematoxilina férrica de Weigert (tinción).
- Lavar en flujo de agua corriente hasta que el agua salga clara.
- 05 a 10 minutos en Rojo Masson. (tinción).
- 10 minutos diferenciar con ácido fosfotúngstico.
- Lavar en flujo de agua corriente.
- 02 a 05 minutos contrateñir con Verde Luz.
- Lavar en flujo de agua corriente hasta que el agua salga clara.
- 03 minutos en alcohol de 96º (deshidratación).
- 03 minutos en alcohol de 100º (deshidratación).
- 03 minutos de aclarado con xilol.
- Montaje.
- Dejar secar los portaobjetos en la estufa de 37ºC.