



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

**Modificación del patrón de expresión de genes TLR4,
TLR5 y MyD88 en dos estirpes de pollo infectados
con *Salmonella* Enteritidis**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:**

ISRAEL MONROY BECERRA

TUTOR:

**UNAM - FMVZ Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco
COMITÉ TUTORAL**

FMVZ – UNAM Dr. Ernesto Ávila González

Dra. María del Carmen Maldonado Bernal

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

México, D.F. Agosto 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a quien siempre me ha brindado su apoyo, mi familia, mi padre: Jesús Monroy Becerra, mi madre: Irma Becerra Sánchez y a mis hermanos: Luz y Jesús Moisés Monroy Becerra, ellos siempre han estado ahí, en todo momento.

También a mi esposa Rocío Macas de Monroy y mis hijos Cristopher Madrid Macas y Douglas Carranza Macas quienes me ha apoyado, y siempre me han dicho que siga adelante y no que nunca me rinda y que siempre hay una solución para todo, que luche por lo que quiero en la vida, por que somos los dos unos luchadores. Y me han brindado todo su amor y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por ser mi segunda casa, siempre me la viví aquí en clases o estudiando o trabajando y por que además siempre seré parte de esta magnífica casa de estudios. Además de que gracias a esta magnífica universidad soy un profesionista en donde conocí amigos que llevo para toda mi vida.

A la Dra. Odette Urquiza Bravo quien siempre me ayudo, alentó y nunca me dejo solo y estaba ahí cuando yo más necesitaba ayuda y apoyo. Gracias por los años de amistad y que sean muchos más.

A mis amigos que siempre me echaron muchas porras en esos momentos en que me sentía debilidad y no veía la luz al final del camino.

A los miembros del comité tutorial al Dr. Ernesto Ávila González y la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal por todos los consejos que me brindaron durante mi formación en la maestría y además por que gracias a su apoyo, consejos y paciencia logre terminar este trabajo.

Así como a mi tutora, maestra, amiga la Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco.

Y a todas las aves que me ayudaron a conseguir esta meta más en vida. Gracias a su vida yo estoy en este momento aquí.

RESUMEN

Modificación del patrón de expresión de genes TLR4, TLR5 y MyD88 en dos estirpes de pollo infectados con *Salmonella* Enteritidis

Se ha notificado que los receptores de tipo Toll (TLRs) en mamíferos juegan un papel fundamental en la inmunidad innata, la presencia de los TLRs se mantiene con una notable coherencia en todas las especies de vertebrados. En este contexto de la conservación filogenética, las diferencias sutiles en los componentes que conforman esta vía pueden tener implicaciones importantes para susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades a través de la defensa específica del hospedador frente a patógenos clave. Se realizó la comparación en la expresión de los genes que codifican para TLR4 y 5 entre dos estirpes de pollo con diferente fondo genético (estirpes pesadas y estirpes ligeras) se desafiaron aves de 1 día de edad con *Salmonella* Enteritidis FT13A, a las 48 horas post-inoculación se obtuvieron muestras de bazo, duodeno, médula ósea para determinar la expresión del ARNm en las muestras de pollo de engorda y postura. A través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se determinó que ambas líneas de aves con fondo genético diferente expresaron los genes en citados, existió una diferencia en la intensidad de expresar los genes. El TLR4 se expresó más en el pollo de engorda; al igual que el TLR5 este se expresó de manera más intensa; lo que pudiera sugerir su intervención en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Además no existen a la fecha suficiente información relacionada en aves con las vías de señalización intracelular notificadas en mamíferos, donde la vía dependiente de MyD88 juega un papel primordial a nivel intracelular para el desarrollo de una respuesta inmune innata, en este estudio se observó una mayor intensidad en la expresión de gen en la estirpe pesada, sugiriendo que esta estirpe es menos susceptible a desarrollar infecciones por *Salmonella* al expresar el gen. Es conveniente realizar más estudios con más aves y más moléculas de la cascada de señalización para profundizar y ampliar más los conocimientos de los TLRs en aves.

Palabras clave: *Salmonella* Enteritidis, TLR4, TLR5, MyD88, PCR en tiempo real, pollo de engorda, gallina de postura.

ABSTRACT

Modification of the gene expression pattern of TLR4, TLR5 and MyD88 in two lines of chicken infected with *Salmonella* Enteritidis

It has been reported that Toll-like receptors (TLRs) in mammals play a huge role in innate immunity, the presence of TLRs is maintained with a high degree of consistency in all vertebrate species. In the phylogenetic conservation context, subtle differences in the components that conform this pathway may have important implications for susceptibility or resistance to disease through specific host defense against pathogens key. In this study was compared the expression of genes encoding for TLR4 and 5 between two different strains of chicken genetic background (broiler strains and layers strains) birds were challenged 1 day age with *Salmonella* Enteritidis FT13A , at 48 hours post-inoculation samples were obtained from spleen, duodenum, bone marrow to determine mRNA. Through in real time the chain reaction in polymerase was determined that both lines of birds with different genetic background expressed aforementioned genes, whether there was a difference in the intensity of expressing these genes, TLR4 was more expressed in broilers, than in layers strains, but the TLR5 gene was expressed more intensely in layer hen , which might suggest their involvement in susceptibility to developing the disease. In addition there are no reports yet on birds about intracellular signaling pathways as in mammals, where MyD88 - dependent pathway plays a major role at the intracellular level for the appropriate development of an innate immune response, in this study there was a higher intensity in MyD88 gene expression in layers hens than in broilers, which could suggest that this strain is less susceptible to infection by *Salmonella*. It is suitable for further studies with more birds and more molecules of the signaling cascade to deepen and expand the topic more.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, TLR4, TLR5, MyD88, Real-time PCR, broiler, layer hen.

CONTENIDO

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
Contenido	VI
Introducción	1
Material y métodos	14
Resultados	27
Discusión	35
Conclusiones	47
Literatura Citada	49

Modificación del patrón de expresión de genes *TLR4*, *TLR5* y *MyD88* en dos estirpes de pollo infectados con *Salmonella* Enteritidis

Introducción

Salmonella

Salmonella enterica serovar Enteritidis es un bacilo gram-negativo, puede estar presente en el tracto intestinal de humanos y algunos animales infectados, incluyendo a las aves, es capaz de producir una amplia variedad de signos clínicos que van desde un estado de portador asintomático hasta una sepsis potencialmente mortal. La infección en humanos es una enfermedad que se caracteriza por gastroenteritis y es llamada salmonelosis o paratifoideas.^{1,2,3}

Infección en humanos por el género *Salmonella*

Las dos serovariedades que afectan principalmente a la población y que son las más frecuentemente notificadas alrededor del mundo son *Salmonella* Typhimurium (ST) y *Salmonella* Enteritidis (SE). La mayoría de las personas infectadas con cepas de *Salmonella* desarrollan como signos clínicos los siguientes: diarrea, fiebre y molestias abdominales; entre las 12 a 72 horas después de la infección. La enfermedad es autolimitada ya que afecta principalmente al tracto gastrointestinal, generalmente dura de 4 a 7 días, aunque el 5% de las personas infectadas pudieran desarrollar un estado séptico.^{1,2,3}

Se ha documentado, que una de las principales fuentes de infección en la población humana es la ingestión de productos y subproductos avícolas contaminados con *Salmonella*. En México en el año 2000 se documentó el aislamiento de *Salmonella* spp en un 51% en alimentos preparados, 23% en productos cárnicos (jamón, longaniza, chorizo, queso de puerco), 22% en carne molida (res, pollo, pescado), 3% en lácteos y 1% en huevo fresco y en polvo.⁴

La incidencia de las enfermedades paratifoideas en los humanos, se incrementó en los Estados Unidos de Norte América drásticamente entre 1980 y el 2003. Se estimó que ocurrieron alrededor de 3.7 millones de casos de enfermedades paratifoideas anuales. Entre los patógenos bacterianos identificados, *Salmonella* Enteritidis (SE) produce el mayor número de brotes de enfermedad de origen alimentario. Esta bacteria es de suma importancia en salud pública, debido a que el individuo que se infecta con *Salmonella* queda como portador asintomático de por vida.^{2, 3, 5,6}

Infección en aves por el género *Salmonella*

En las aves la infección por *Salmonella* inicia con la colonización del tracto gastrointestinal, posteriormente se produce una infección sistémica, incluyendo la invasión del tejido reproductivo. Cuando *Salmonella* llega a los folículos,

permanece en los huevos y estos son ovopositados por las gallinas infectadas.^{2,3,7,8}

Por otro lado existe información, la cual menciona que las heces de pollos infectados por *Salmonella*, pueden contaminar las canales en la planta de procesamiento y en los rastros, durante este procesamiento se puede contaminar el agua en el tanque de escaldado o al momento de evisceración.^{3,9}

La salmonelosis en aves jóvenes en los sistemas de producción avícola, es una enfermedad que representa una gran pérdida económica; las infecciones por ST y SE en las aves adultas constituyen un riesgo para la salud pública debido a que es una enfermedad zoonótica.^{2,10}

Resistencia genética al desarrollo de infecciones por el género

Salmonella

El desarrollo de infecciones por el género *Salmonella* en las aves, se ha investigado a partir de líneas puras como: White Leghorn, Light Sussex, Rhode Island, Brown Leghorn y algunas aves parcialmente puras de la línea White Leghorn. Bumstead y colaboradores en 1988, demostraron que las líneas White Leghorn son resistentes a *Salmonella* Typhimurium, de todas las aves desafiadas, el 70% sobrevivió y el 30% murió posterior a la infección experimental, sin embargo; otras líneas fueron demasiado susceptibles ya que el índice de mortalidad osciló en un rango del 70 al 100% 7 días post inoculación experimental

(PIE), como en el caso de la línea Brown Leghorn. Además de observar la susceptibilidad y resistencia al desafío contra ST, se observó que esta resistencia cruzó para otros serotipos de *Salmonella* como Gallinarum, Pullorum y Enteritidis en las aves susceptibles, demostrando que las diferencias en la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* en estas aves, está relacionada con la carga bacteriana en el hígado y en el bazo. Un número significativamente mayor de *Salmonella* fue aislado de bazo e hígado de las aves susceptibles en comparación con las aves resistentes lo que sugiere que, la resistencia a la salmonelosis en aves se relaciona con una mayor capacidad del sistema retículoendotelial para controlar la proliferación bacteriana durante la etapa temprana de la infección.^{2, 10, 11,12}

La respuesta inmune innata y los patrones moleculares asociados a patógenos

En la respuesta inmune específica, como en la respuesta inmune innata existe un cierto grado de especificidad. El sistema de reconocimiento de la respuesta inmune innata, por lo general consta de proteínas solubles o proteínas de membrana, que reconocen estructuras químicas de los antígenos, principalmente carbohidratos y lípidos que se encuentran formando parte de la mayoría de los microorganismos, a estas moléculas se les conoce como *PAMPs* (por sus siglas en inglés: *pathogen associated molecular patterns* o patrones moleculares asociados a patógenos), son estructuras diferentes a las moléculas presentes en

las células del hospedero, con la finalidad de que las moléculas propias del organismo no sean reconocidas como extrañas por el sistema inmune y así evitar que se active la respuesta inmune contra células propias y ser eliminadas.¹³

Los *PAMPs* tienen ciertas características que los hacen blancos ideales para la respuesta innata y estos pueden ser reconocidos por receptores estratégicamente presentes en las células que primero entran en contacto con los microorganismos, como por ejemplo las células que participan en la respuesta inmune innata y algunas células epiteliales. Estos receptores reciben el nombre de *PRR* (por sus siglas en inglés *pattern recognition receptors* o receptores de reconocimiento patrón), dentro de los cuales, un grupo de proteínas transmembranales a las cuales se les ha denominado *TLRs* (por sus siglas en inglés *Toll-like receptors* o receptores tipo-Toll), se encuentran presentes en insectos así como en mamíferos y primates superiores, incluyendo el humano.¹³

Los receptores tipo-Toll

Los *TLRs* son proteínas transmembranales que consisten de dos dominios: un dominio extracelular rico en leucina (*LRRs*), el cual es el que participa en el reconocimiento y la unión con su agonista y un dominio intracelular, con una terminación de señalización denominada *TIR* (Toll-IL-1-receptor), este dominio inicia la cascada de señalización intracelular mediante la interacción con la familia de proteínas adaptadoras.¹⁴

Los *TLRs* de los vertebrados se identifican por el tipo de *PAMP* que reconoce, aunque algunos genes que constituyen a cada *TLR* se han perdido o adquirido durante el proceso de la evolución entre las diversas especies, por lo que la funcionalidad de cada *TLR* no se realiza de manera adecuada o se lleve a cabo en una forma diferente.¹⁴

El *TLR2* reconoce lipopéptidos, el *TLR3*, *TLR 4* y *TLR 5* reconocen ARN de doble cadena, LPS (lipopolisacárido) y flagelina respectivamente. Los *TLRs 7,8* y *9* están implicados en el reconocimiento intracelular de ácidos nucleicos. El *TLR11* aún no ha sido determinado.¹⁴

En el área de la medicina veterinaria se han caracterizado algunos *TLRs* en aves (*chTLR2* y *4*), en bovinos (*BoTLR2* y *4*), en cerdos (*sTLR2* y *9*), en caballos (*TLR2* y *4*), *TLR* en perros (*TLRs 2,4* y *9*) y en gatos (*TLRs 1, 2, 4, 5, 7, 8* y *9*). En el año 2009, ocho *TLRs* funcionales fueron identificados en pollos; *TLRs 2, 3, 4, 5, 7, 15, 16, y 21*,^{12,13,19, 20, 21,22,23,24,25,26,27} Sin embargo, en 2011, ya se habían identificado trece *TLRs* en mamíferos, mientras que en el genoma de los pollos sólo se han notificado diez *TLRs* aviares (*chTLRs*), nombrados *TLR 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3, 4, 5, 7,15* y *21*).^{15,16}

En aves jóvenes la respuesta inmune innata, es particularmente importante ya que la respuesta adquirida no se desarrolla completamente hasta la primera semana de edad, de aquí la importancia de conocer la función de cada TLR en aves.^{17,18}

Los siguientes *TLRs* y sus agonistas han sido identificados en pollos y son el centro de múltiples revisiones:

TLR1-1 (forma un dímero con *TLR2B*).

TLR1-2 forma un dímero con ambos *TLR2s*.

TLR2-1, ligandos: peptidoglicanos y lipopéptidos bacterianos;

TLR2-2, ligandos: lipopéptidos bacterianos y lipopolisacárido (*LPS*);

TLR3, ligando: *ARN* de doble cadena y Poly I:C;

TLR4, ligando: *LPS*;

TLR5, ligando: flagelina bacteriana;

TLR7, ligando: *ARN* de cadena sencilla;

TLR8 está interrumpido y no posee una función específica;

TLR15, único de especies aviares y de regulación positiva en respuesta a infección por SE;

TLR21, su función es desconocida y es único para especies aviares y peces.

^{19,20,21,22,23,24,25,26}

Los *TLRs* son un componente crítico en la respuesta inmune innata, la importancia de este tipo de receptores se enfoca en que cada uno puede estimular señales diferentes y esta estimulación da como resultado la liberación de mediadores inflamatorios tales como: citocinas, quimiocinas y leucotrienos que forman parte de

la respuesta inmune innata y así estimulan a la célula, que está reconociendo al microorganismo, para que realice una función efectora. Las células que participan en la respuesta inmune innata, pueden modular la respuesta inmune específica propiciando que se desarrolle una respuesta efectiva y apropiada, según el tipo de infección que se presente.^{16,27,28}

Señalización

El reconocimiento de los ligandos a través de los *TLRs* está acoplado a eventos de señalización mediante proteínas adaptadoras e intermedias que producen la activación de factores de transcripción. Hay evidencia de que en varias especies de vertebrados, la función de las proteínas adaptadoras a los *TLRs* está ligada a incrementar la resistencia a una gran variedad de enfermedades infecciosas.^{27, 29,}

30

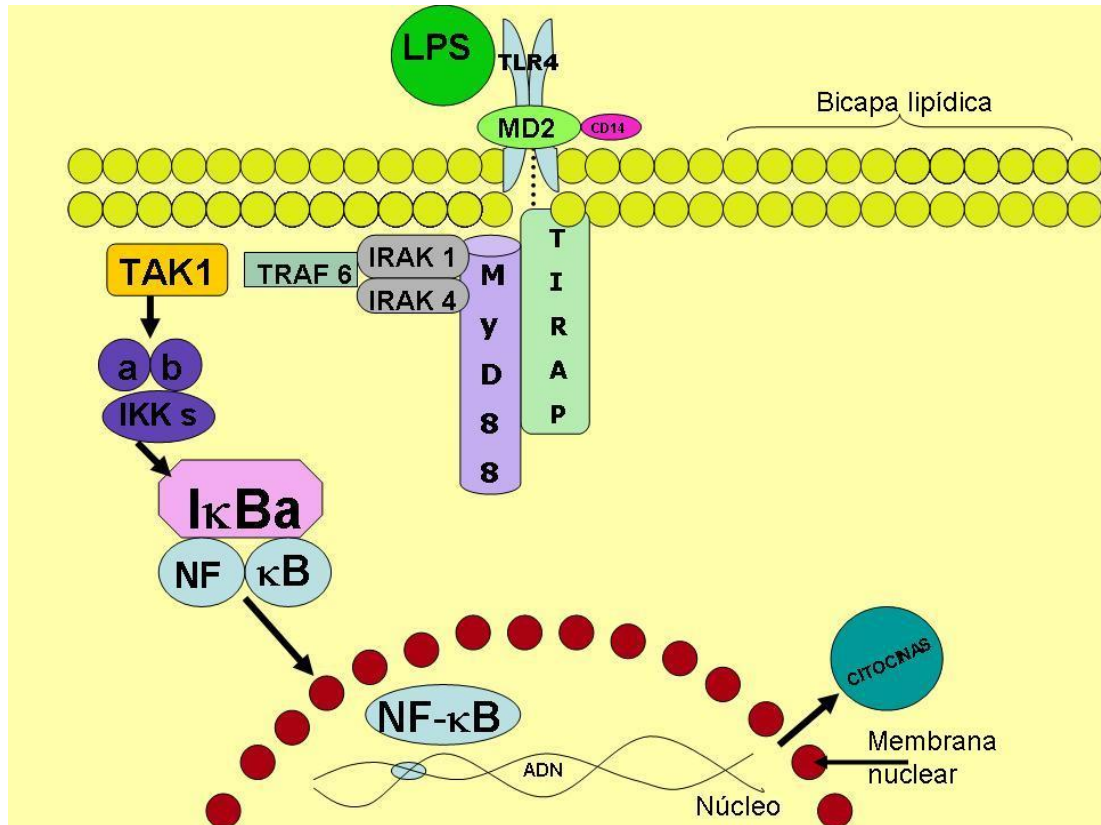
Como se mencionó anteriormente, el dominio extracelular de los *TLRs*, participa en el reconocimiento y la unión con sus ligandos y el dominio intracitoplasmático con su terminación *TIR* (Toll-IL-1-receptor), inicia la cascada de señalización intracelular mediante la interacción con la familia de proteínas adaptadoras.¹⁴

Después de que el *TLR* reconoce a su agonista, recluta a la proteína adaptadora, que puede ser *MyD88* (del inglés *Myeloid differentiation primary response gene [88]* o gen 88 de la respuesta primaria de la diferenciación mieloide), con lo que se inicia la cascada de señalización, denominada vía dependiente de *MyD88*, ésta adquiere la capacidad de reclutar a *IRAK* (del inglés Interleukin-1 receptor-

associated kinase o Cinasa Asociada al Receptor de Interleucina-1) que a su vez activa la ubiquitin ligasa E3 asociada a *TRAF6* (del inglés TNF receptor associated factor 6 o Factor 6 asociado al Receptor del Factor de Necrosis Tumoral).

El *TRAF6* subsecuentemente activa a TAK1 (TGF-beta activated kinase 1 ó cinasa 1 activada por *TGF-β* (factor de crecimiento transformante beta)). La activación de *TAK1* conduce a la activación del factor de transcripción NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), mediante la inducción de la fosforilación de sus inhibidores asociados o a la activación del factor de transcripción *JNK* (del ingles *c-Jun N-terminal kinases* o cinasas amino-terminal c-Jun), a través de las cinasas *MAPKK3* (del inglés *Mitogen-activated protein kinase kinase 3* o cinasa cinasa 3 de la proteína activada por mitógenos) y *MAPKK6*. La activación de los factores de transcripción induce su translocación al núcleo e inducen la expresión de una amplia gama de genes de respuesta inmune. En la figura 1 se observa la señalización del TLR4 en un enterocito.^{14,31}

Figura 1. Señalización del TLR4 en enterocitos.



Un resultado de la vía de señalización de los *TLRs* es la inducción de expresión de *AMPs* (del inglés antimicrobial peptides o péptidos antimicrobianos). Los *AMPs* son moléculas efectoras directas del sistema inmune innato que eliminan a los patógenos de la superficie de las mucosas a través de la ruptura de la membrana bacteriana. Estudios recientes han propuesto papeles adicionales para estos péptidos incluyendo la función quimiotáctica de células inmunes y la modulación de la respuesta inmune específica. También se ha observado un aumento o pérdida de genes que codifican para *AMPs*, incluso entre especies estrechamente relacionadas sugiriendo que cada especie puede poseer un conjunto de *AMPs*

apropiados, dependiendo de los desafíos microbianos de su propio ambiente local.

14, 32, 33, 34, 35

Hay evidencia de que algunas especies de vertebrados, poseen deficiencias en sus *TLRs*, como también en la función de las proteínas adaptadoras de los *TLRs* y estas deficiencias están vinculadas a un aumento de la susceptibilidad o resistencia a una variedad de enfermedades infecciosas.²⁷

En otro estudio se demostró que la variación alélica en el gen que codifica *TLR4* está ligado a la susceptibilidad de los pollos a desarrollar infecciones por el género *Salmonella*, con esta observación y otros hallazgos, como la demostración de que la flagelina induce hiperregulación de la respuesta innata en los pollos infectados con *Salmonella*, sugieren que el *TLR 5* es un regulador en la respuesta a una infección por *Salmonella*.^{2, 20,27}

En investigaciones realizadas previamente por Swaggerty y colaboradores en 2003, demostraron las diferencias en la susceptibilidad entre dos distintas líneas de aves pesadas a la infección con *Salmonella*, *Enterococos* y *Campylobacter*. Estas diferencias en la susceptibilidad a desarrollar infección pudieran sustentarse, en parte, a las diferencias en la vía de señalización de los *TLRs*.³⁷ Además, Kogut y colaboradores en 2006, demostraron que el estímulo de *TLRs* con agonistas derivados de bacterias, inducen la expresión de *ARNm* en los heterófilos de pollos resistentes a *Salmonella*, pero no en los heterófilos de pollos susceptibles *Salmonella*. Lo que sugiere que los genes están presentes en

diferentes tipos celulares cuando se presenta una infección y sólo hace falta poder determinar como se pueden activar apropiadamente los genes y así activar la respuesta inmune.^{27,36,37,38,39,40,41,42,43}

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación de ADN, que consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización, alineamiento y extensión. Existen diferentes tipos de PCR entre los que destacan: PCR anidada, PCR *in situ*, PCR múltiple, PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR).⁴⁴

La qPCR es una variación de la técnica de PCR punto final y se puede emplear para la cuantificación del ADN y de forma indirecta del ARNm en una muestra. También sirve para monitorear la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre, además la qPCR es más sensible. Uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una qPCR, es la calidad del material de inicio, lo que disminuye el riesgo de falsos negativos, también es más rápida y tiene menos probabilidad de contaminación, con lo que disminuyen los falsos positivos. Cabe destacar otras utilidades de la qPCR como: la cuantificación viral, la cuantificación de la expresión de genes, el control de la eficacia de fármacos, la detección de agentes infecciosos, el diagnóstico de tumores y la detección de polimorfismos, entre otros.⁴⁴

Justificación

Debido a la falta de información sobre la expresión diferencial de ARNm para los genes *TLRs* 4, 5 y que la función de expresión de estos receptores no se ha definido completamente en las aves; y que estos receptores juegan un papel primordial en las infecciones por el género *Salmonella*, en donde la expresión de estos *TLRs* intervienen de manera importante en la susceptibilidad o resistencia a la infección, es necesario determinar su asociación con la resistencia/susceptibilidad a *Salmonella* y por lo tanto su repercusión en la respuesta inmune. También es necesario conocer el nivel de expresión de MyD88 ya que esta molécula interviene en la cascada de señalización, y es un componente crítico y alternativo de la vía de señalización interna del TLR en las células estimuladas.

Objetivo

Evaluar el patrón de expresión de receptores tipo-Toll (*TLR4*, *TLR5*) y la molécula de señalización *MyD88* en bazo, intestino y medula ósea de pollos inoculados con *Salmonella* Enteritidis FT 13A en estirpes pesadas y en estirpes ligeras para conocer su resistencia/susceptibilidad a la infección.

Hipótesis

La susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* Enteritidis está determinada por el patrón de expresión del *TLR4* y del *TLR5* y por la expresión y activación de *MyD88*.

Material y métodos

Aves

Se utilizaron aves de la estirpe Ross x Ross 308 (estirpes pesadas que dan origen al pollo de engorda) y Hy-line W36, (estirpes ligeras que son las que dan origen a la gallina de postura).

Bacteria

Se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis FT13 A, obtenido del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves (DMZA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se reactivó la bacteria en pollitos SPF (aves libres de patógenos específicos de 1 día de edad), promoviendo su virulencia y se cuantificó para asegurar la concentración deseada.

Alojamiento

Las aves fueron alojadas en las unidades de aislamiento del DMZA de la FMVZ de la UNAM. Estas aves se mantuvieron en corrales en piso. El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum*. El calendario de iluminación que se aplicó fue de 24 horas luz, de acuerdo a lo indicado por el manual de las estirpes utilizadas (Ross x Ross 308 y Hy-line W36).

El experimento se realizó utilizando 5 aves de estirpe pesada (Ross 308), de 1 día de edad y 5 aves ligeras (Hy Line W36) de 1 día de edad; los cuales se alojaron por separado. Se empleó un diseño completamente al azar de 4 tratamientos; como se indica a continuación:

Diseño experimental

Grupo 1: 3 aves pesadas, que correspondieron al grupo de infectados.

Grupo 2: 3 aves ligeras, que correspondieron al grupo de infectados.

Grupo 3: 2 aves pesadas, no infectados.

Grupo 4: 2 aves ligeras, no infectados.

En los grupos que correspondieron a las aves infectadas al día de edad, los tratamientos fueron administrados por vía oral, con 250 µl como dosis única de una suspensión de *Salmonella* Enteritidis FT13 A que contenía 1×10^9 UFC / ml.

Los grupos que correspondieron a las aves no infectadas, fueron inoculados con 250 µl de solución salina fisiológica (SSF) por vía oral.

A las 48 horas posteriores a la inoculación de los 4 tratamientos se procedió a la obtención de muestras a partir de bazo, duodeno y médula ósea. Cada muestra se tomó de manera aséptica y se colocaron en envases estériles mantenidos en hielo seco, después se mantuvieron a -20 °C hasta su empleo.

Diseño de iniciadores

Usando la base de datos del *Gen Bank* se buscó el ARNm aviar para diseñar los cebadores utilizados en el proyecto, en este caso *TLR4*, *TLR5* y *MyD88*. Ya obtenido el ARNm, se insertó la información genética en el sitio en línea del Laboratorio Roche (<http://www.roche-as.es/?mod=5&id=2>), a través del programa se crearon los iniciadores, se eliminaron los intrones y se dejaron los exones para que pudiera servir como punto de partida para la replicación del ADN.

Se realizó el diseño de la siguiente forma: Primero se busco el ARNm de beta-actina;

```
cacggtattgtcaccaactgggatgacatggagaagatctggcaccacaccttctacaatgagttgcgtgttgct  
ccagaggagcacctgtcctgcttactgaggccccgctgaaccctaaagccaacagggagaagatgaccaga  
tcatgtttgagacctcaacactccagctatgtacgtggccatccaggctgtgctgtccctttatgcctctggtcgcacc  
accggcatcgtcatggactctggtgatggtgtt.
```

Se ingresó todo a la pagina de Roche (anteriormente mencionada) y se obtuvieron los iniciadores (primer) *left del ingles* (izquierdo) y *right del ingles* (derecho) y además el mismo programa facilitó el número de catálogo de la sonda con la que hay que trabajar. En este caso este iniciador fue el del gen de referencia Beta-actina (cuadro1). Para los otros genes que se usaron para el experimento (*TLR4*, *TLR5* y *MyD88*), ver cuadros del 2 al 4.

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores de Beta actina

Sonda #7 (cat. no. 04685059001)

Iniciador	Peso	Posición	Temp. De fusión	% GC	Secuencia
Izquierda	20	133-152	59	60	ccctgtcctgcttactgagg
Derecha	21	202-222	60	52	gctggagtggtgaaggtctca
Amplicon (90nt)					

ccctgtcctgcttactgaggccccgctgaaccctaaagccaacagggagaagatgaccagatcatgtt
gagacctcaactccagc

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores de TLR4

Sonda #128 (cat. no. 04693647001)

Iniciador	Peso	Posición	Temp. De fusión	% GC	Secuencia
Izquierda	20	220-339	59	55	acctaccatcggaacttg
Derecha	21	259-279	59	43	caatgtgttatggccagat
Amplicon (60nt)					

acctaccatcggaacttgataccctgcaggagctgaatctggccataacaacattg

Cuadro 3. Secuencia de iniciadores de TLR5

Sonda TLR5 Use probe #9 (cat. no. 04685075001)

Iniciador	Peso	Posición	Temp. De fusión	% GC	Secuencia
Izquierda	20	1997-2016	59	45	gggcattgtttgtctggt
Derecha	20	2037-2056	59	50	ggtggatggcttctatcaa
Amplicon (60nt)					

gggcattgtttgtctggtataagaccatcaccaaaactttagtaggaagccatccacc

Cuadro 4. Secuencia de iniciadores MyD88

MyD88 Use probe #38 (cat. no. 04687965001)

Iniciador	Peso	Posición	Temp. De fusión	% GC	Secuencia
Izquierda	19	2520-2538	59	58	ctgccgtgcatagcaggt
Derecha	21	2560-2580	60	48	tcaacaactgcctctcttgg
Amplicon (61nt)					

ctgccgtgcatagcaggtgctgtgctgcttctctctggccaagagaggaagttgtga

Extracción de ARN

Este método fue realizado con un equipo automatizado QIAcube, utilizando un paquete comercial RNeasy®¹ que consta básicamente de lo siguiente:

Procedimiento

Se tomaron 2 mg de cada muestra de tejido por separado y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 ml, para agregar el RNAlater¹ (estabilizador de tejido); 5 min después se agregaron 350 µl de regulador RLT¹ (solución de lisis) y se incubó a temperatura ambiente 2 min. Esta muestra se colocó en el Adaptor Layer¹ durante 2 minutos (min) a 20 Hertz (Hz). Se tomó el sobrenadante y se repitió el procedimiento con la solución RLT, posteriormente se centrifugó por 3 min a máxima velocidad a 4°C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. En este nuevo tubo se agregó un volumen de etanol al 70%, se homogenizo y se transfirió a una columna para centrifugarse a 8000 x g (gravidades o 10,000 rpm), durante 15 seg. Una vez centrifugada la muestra, se le agregaron 350 µl de solución amortiguadora RW1¹ (solución de lavado) y nuevamente se centrifugó a 8000 x g por 15 seg, posteriormente se procedió a lavar la membrana de la columna, desechando el sobrenadante y se agregaron 10 µl de solución stock DNase I¹ y 70 µl de regulador RDD¹ (digestor y fijador) permitiendo una incubación a temperatura ambiente por 15 min. En seguida se agregaron 350 µl de solución RW1¹ y nuevamente se centrifugó por 15 seg a 8000 x g, descartando el sobrenadante,

¹ Quiagen, México, 01090

añadiéndose 500 µl de regulador RPE¹ (solución de lavado) para centrifugarse nuevamente por 15 seg a 8000 x g. El sobrenadante se descartó y se agregaron 500 µl de etanol al 80% y se centrifugó en las mismas condiciones anteriormente descritas y se lavó nuevamente, se volvió a centrifugar a alta velocidad por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el material genético se colectó en un tubo de 1.5ml, se agregaron 14 µl de agua libre de RNasa y se centrifugó por última vez por 1 min a velocidad máxima para sedimentar el ARN.

Cuantificación de las muestras

Se realizó la cuantificación de las muestras a través de un Espectrofotometro² la siguiente forma: primero se realizó la calibración del equipo con agua libre de RNasa, se agregó 1 µl de muestra de ARN, se realizó la lectura de cada muestra y se anotó la concentración de cada una (cuadro 5).

² THERMO SCIENTIFIC, Nanodrop 2000c, México, 03100

Cuadro 5. Concentración de las muestras cuantificadas

Muestra	ng / ul	2.5 µg
2B	1515	1.7
2D	271	9
2MO	1640	1.5
8D	1638	1.5
8B	1597	1.6
8MO	1647	1.5
9B	494	5
9D	388	6
9MO	1660	1.5
19B	358	7
19D	492	5
19MO	1531	1.6
35B	233	11
35D	332	8
35MO	1391	1.8
36B	251	10
36D	508	5
36MO	219	11

Realización de transcripción inversa (RT)

Posteriormente se realizó la transcripción inversa de cada una de las muestras de RNA de la siguiente forma:

Se colocaron de 1-5 µg de RNA total, en un tubo nuevo para PCR de 200 µl. Después se adicionó 1 µl de oligo dT y se colocó en el termociclador², se seleccionó el programa, incubando a 70°C por 10 minutos, las muestras se sacaron del mismo y se colocaron en hielo por 5 minutos. Se preparó una mezcla con lo siguiente: regulador 4 µl, DTT¹ 12 µl, y dNTPs¹ 1 µl por cada muestra. Se

¹ Quiagen, México, 01090

² THERMO SCIENTIFIC, Nanodrop 2000c, México, 03100

homogeneizó con el vortex y se centrifugó por 20 seg, posteriormente se incubó la muestra por 2 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se agregó 1µl de RT¹ (200U) para posteriormente incubarse a temperatura ambiente por 8 min. En seguida se colocaron las muestras en el termociclador² y se dejó que el programa continuara a una temperatura de 42°C por una hora y luego a una temperatura de 65 ° C por 5 min, se dejó que la temperatura disminuyera a 4°C y se colocaron las muestras a -20°C hasta la realización del PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

Para hacer la PCR en tiempo real primero se realizó una mezcla de reactivos como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 6. Concentración y volumen de la reacción de qPCR

Reactivo	Concentración	Volumen 1X	Volumen 12
Agua		1.5 µl	18 µl
Sonda	10 µM	0.5 µl	6 µl
Iniciador F	5 µM	0.25 µl	3 µl
Iniciador R	5 µM	0.25 µl	3 µl
MM		5.00 µl	60 µl
ADNc	(1:5)	2.5 µl	30 µl

MM: mezcla maestra, R: revers, F: forward, ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario, µl: microlitros, µM: microMolar.

Se mezclaron todos los reactivos del cuadro 1 y al final se colocó el ADN de cadena sencilla sintetizado, en cada uno de los pozos. Se centrifugó a 2500 rpm

² THERMO SCIENTIFIC, Nanodrop 2000c, México, 03100

por 10 seg. Se programó el termociclador², se colocó la placa y se dejó correr el programa de amplificación con las siguientes condiciones:

Preincubación; 1 ciclo de 95°C por 10min.

Amplificación 45 ciclos:

95°C 10 seg.

60°C 30 seg.

72°C 1 seg.

Enfriamiento: 40°C 30 seg.

Al finalizar los 45 ciclos se retiró la placa y se procedió a la lectura de los resultados, ver cuadros del 7 al 10.

² THERMO SCIENTIFIC, Nanodrop 2000c, México, 03100

Cuadro. 7 Beta Actina Medias y desviaciones estándar

MUESTRA	Media Cp	STD Cp
2B	24.63	0.03
2D	25.01	0.04
2MO	25.02	0.11
8B	26.26	0.04
8D	25.56	0.08
8MO	24.82	0.04
9B	26.26	0.13
9D	27.20	0.01
9MO	27.05	0.10
19B	28.82	0.02
19D	26.15	0.08
19MO	26.15	0.08
35B	24.44	0.15
35D	24.51	0.15
35MO	22.39	0.09
36B	25.41	0.27
36D	26.92	0.15
36MO	22.59	0.57

B= bazo, D=duodeno, MO= Medula Ósea, STD= desviación estándar, Cp (del *inglés crossing point* o punto de cruce).

Cuadro. 8 TLR4 Medias y desviaciones estándar

MUESTRA	Media Cp	STD Cp
2B	23.74	0.03
2D	23.75	0.05
2MO	24.68	0.80
8B	26.00	0.02
8D	25.62	0.92
8MO	24.04	0.44
9B	25.30	0.07
9D	26.16	0.03
9MO	27.03	0.05
19B	28.57	0.33
19D	25.81	0.16
19MO	25.81	0.16
35B	23.77	0.14
35D	23.67	0.07
35MO	22.15	0.16
36B	24.91	0.06
36D	25.76	0.11
36MO	21.38	0.01

B= bazo, D=duodeno, MO= Medula Ósea, STD= desviación estándar, Cp (del *inglés crossing point* o punto de cruce).

Cuadro. 9 TLR5 Medias y desviaciones estándar

MUESTRA	Media Cp	STD Cp
2B	22.53	0.27
2D	25.25	0.09
2MO	26.01	0.08
8B	24.96	0.26
8D	24.05	0.00
8MO	23.97	0.25
9B	23.35	0.10
9D	25.86	0.03
9MO	25.31	0.47
19B	23.47	0.10
19D	26.95	0.38
19MO	27.43	0.22
35B	24.60	0.39
35D	26.90	0.04
35MO	23.68	0.35
36B	27.02	1.12
36D	22.71	0.05
36MO	27.77	0.01

B= bazo, D=duodeno, MO= Medula Ósea, STD= desviación estándar, Cp (del *inglés crossing point* o punto de cruce).

Cuadro. 10 MyD88 Medias y desviaciones estándar

MUESTRA	Media Cp	STD Cp
2B	22.7	0.24
2D	24.2	0.76
2MO	24.2	0.76
8B	22.5	0.22
8D	22.2	0.56
8MO	22.5	0.11
9B	21.4	0.30
9D	25.4	0.27
9MO	25.7	0.20
19B	21.4	0.24
19D	24.0	0.04
19MO	24.3	0.33
35B	23.2	1.19
35D	23.1	0.37
35MO	23.8	0.05
36B	24.1	0.19
36D	22.1	0.48
36MO	20.4	0.04

B= bazo, D=duodeno, MO= Medula Ósea, STD= desviación estándar, Cp (del *inglés crossing point* o punto de cruce)

Método delta delta del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$)

De los datos del termociclador se obtuvo la media de los Cp (del *inglés crossing point* o punto de cruce). Con estos datos se hizo el análisis de los resultados. Para determinar la expresión de los genes se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$. El cual consiste en comparar directamente el delta Ct (ΔCt) de la muestra a probar y el ΔCt del gen de referencia o endógeno en cada muestra y después se comparan los ΔCt de las muestras experimentales de las aves desafiadas con *Salmonella* con respecto a la muestra sin infección.

Dado que el proceso de amplificación de los genes es exponencial con base 2 , es necesario considerarlo y hacer el cálculo correspondiente con el $\Delta\Delta Ct$. Con los resultados de $\Delta\Delta Ct$ se realizó una gráfica de barras de cada gen del experimento.

Normalización

La normalización es el proceso mediante el cual los datos de $\Delta\Delta Ct$ de las aves no infectadas y los $\Delta\Delta Ct$ de las aves infectados se analizan, el resultado del análisis $\Delta\Delta Ct$, se interpretara de la siguiente forma: mayor de 1 significa sobreexpresión y si es menor de 1 significa subexpresión (cuadro 11).

Cuadro 11. $\Delta\Delta C_t$ de todas las muestras

TLR5

Muestras	$\Delta\Delta C_p$
8B	1.14
8D	1.69
8MO	3.58
9B	1.75
9D	8.51
9MO	6.63
35B	4.26
35D	1.67
35MO	1.18
36B	1.55
36D	10.13
36MO	14.42

MyD88

Muestras	$\Delta\Delta C_p$
8B	3.63
8D	2.55
8MO	2.69
9B	7.78
9D	8.69
9MO	1.46
35B	2.79
35D	0.09
35MO	0.10
36B	2.93
36D	1.04
36MO	1.20

TLR4

Muestras	$\Delta\Delta C_p$
8B	0.64
8D	0.40
8MO	1.36
9B	1.05
9D	0.76
9MO	0.81
35B	0.43
35D	1.51
35MO	0.93
36B	0.38
36D	1.88
36MO	0.38

B= bazo, D=duodeno, MO= Medula Osea, Mean= media, STD= desviación estandar, Cp (del *inglés crossing point* o punto de cruce)

Resultados

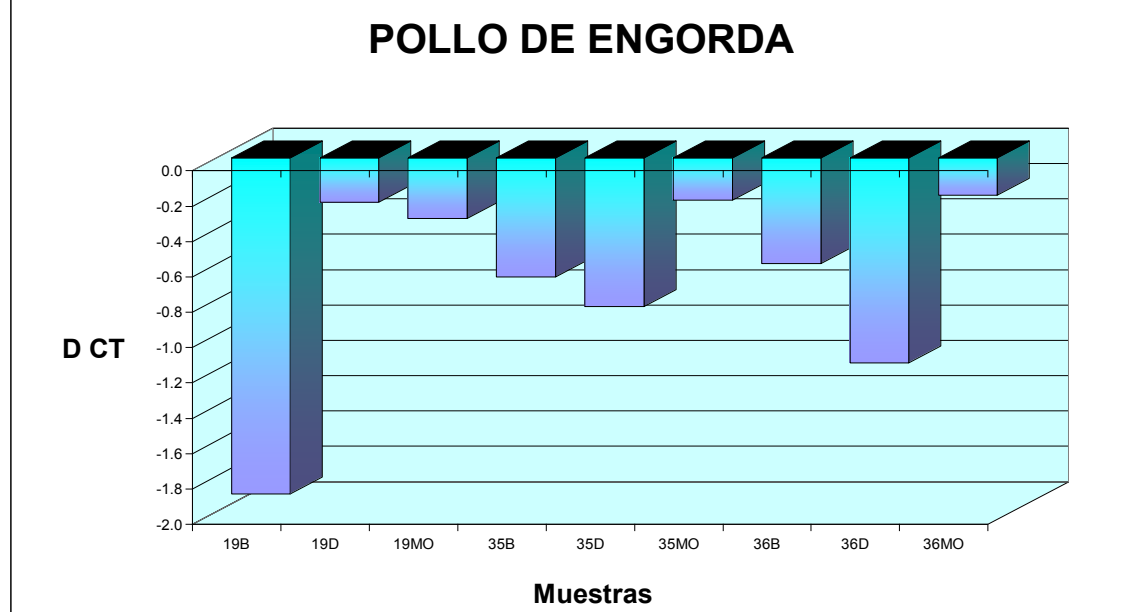
Nivel de expresión de ARN mensajero de los genes en estudio en las aves pesadas y en las aves ligeras

A partir de las muestras de bazo (B), duodeno (D) y de medula ósea (MO), se obtuvo la media geométrica y se calculó $1\Delta Ct$ ($1\Delta Ct$), dicho cálculo, sirvió para expresar la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct del gen en estudio (TLR4, TLR5, MyD88) y los valores Ct del gen endógeno (β actina). De las aves inoculadas con *Salmonella* Enteritidis (SE), en comparación con las aves no inoculados.

TLR4

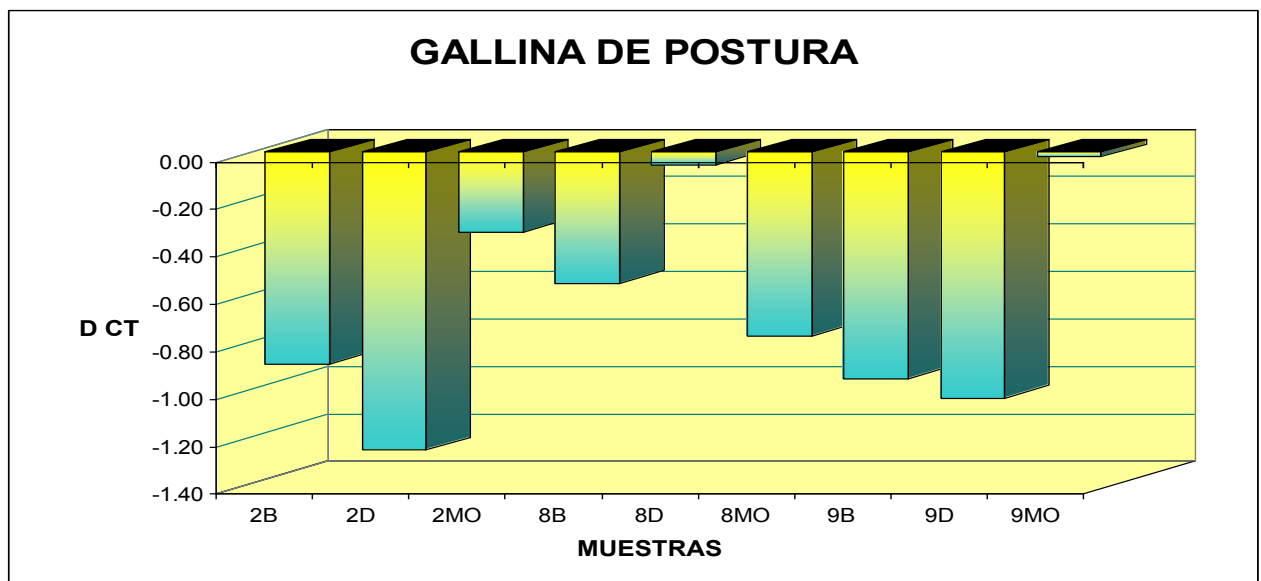
En la figura 2 (Fig.2) se observa la expresión del ARNm del gen TLR4, comparado con el gen de referencia β -actina en las estirpes ligeras, en la figura 3, está esquematizada la expresión del ARNm de las aves de estirpe pesada, en todas las muestras se expresa constitutivamente el gen TLR4.

Figura 2. Representación de la expresión de ARNm del TLR4 en las muestras



La muestra 19 pertenece a aves pesadas sin infección, 35 y 36 son muestras de aves pesadas infectadas con *Salmonella* Enteritidis. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

Figura 3. Representación de la expresión de ARNm del TLR4 en las muestras

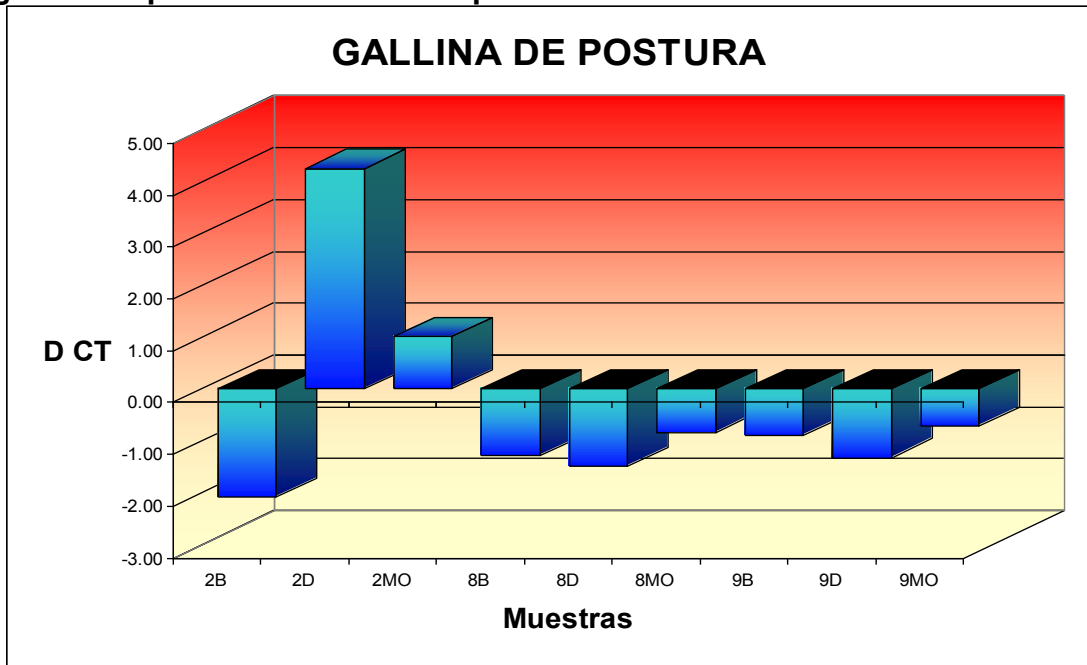


La muestra 2 son de aves ligeras sin infección, 8 y 9 son de aves ligeras infectadas con *Salmonella* Enteritidis. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

TLR5

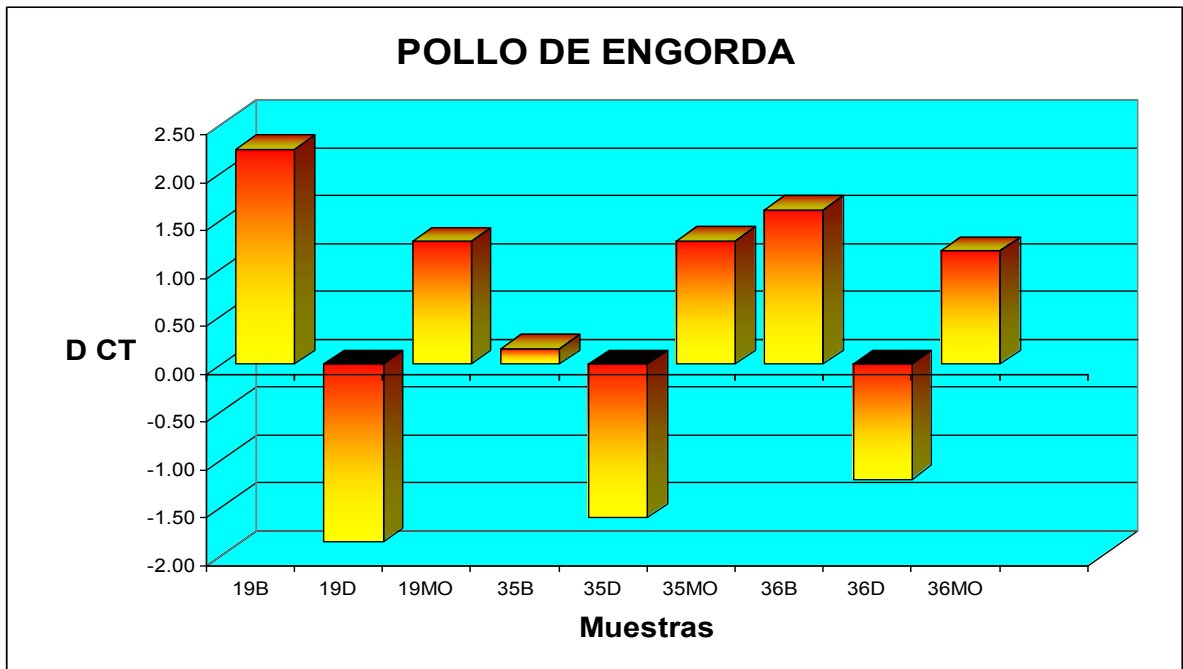
En el caso de TLR5 se observó la expresión del ARNm comparado con β actina, todos los órganos, tanto en los aves de estirpe pesada como en la ligera. Se aprecia la expresión en las figs. 4 y 5 de todos los órganos del experimento.

Figura 4. Representación de la expresión de ARNm del TLR5 en las muestras



La muestra 2 son de aves ligeras sin infección, 8 y 9 son de aves ligeras infectadas con *Salmonella* Enteritidis. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

Figura 5. Representación de la expresión de ARNm del TLR5 en las muestras

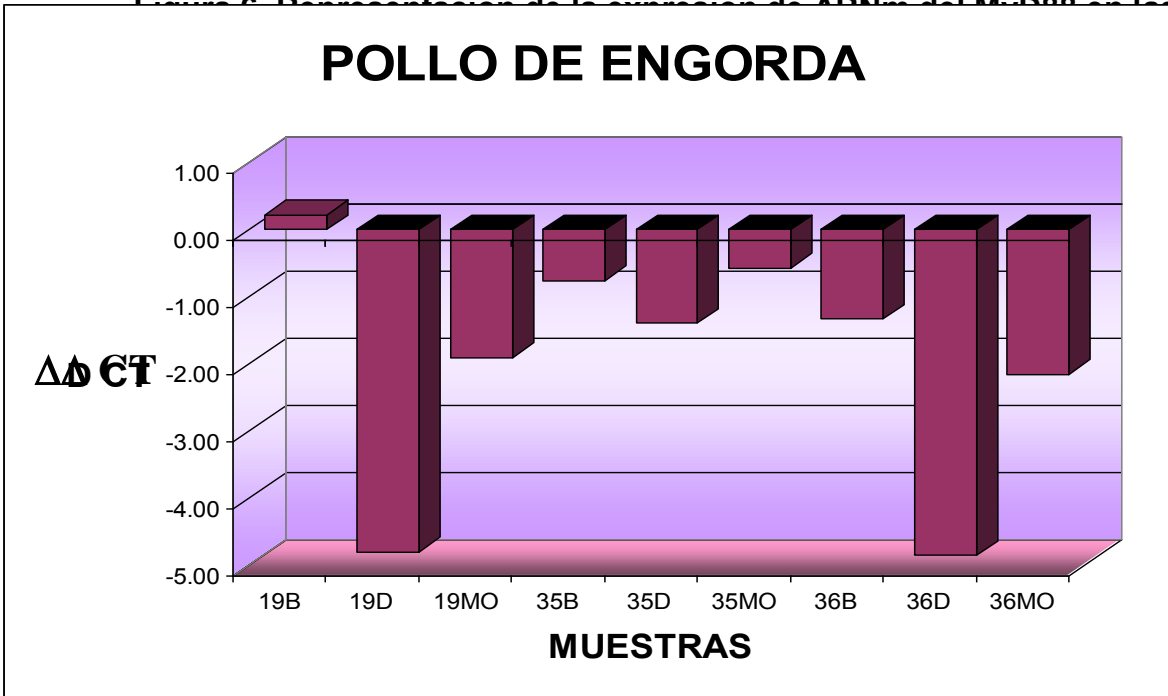


La muestra 19 son de aves pesadas sin infección, las muestras 35 y 36 son de aves pesadas infectadas con *Salmonella* Enteritidis. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

MYD88

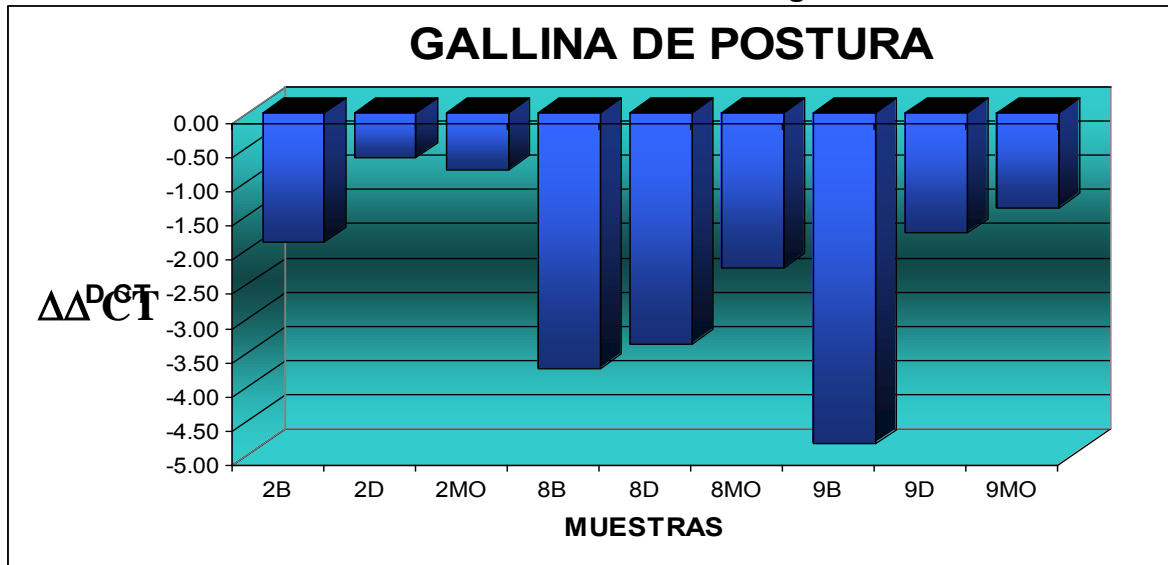
La expresión del ARNm para el gen de MyD88 en las diferentes muestras de las aves pesadas y de las aves ligeras, se presenta tanto en las aves infectadas como en las aves no infectadas (figuras 6 y 7).

Figura 6. Representación de la expresión de ARNm del MyD88 en las



La muestra 19 son de aves pesadas sin infección, la muestra 35 y 36 son de aves pesadas infectadas con *Salmonella* Enteritidis. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

Figura 7. Representación de la expresión de ARNm del MyD88 en las muestras de las aves ligeras



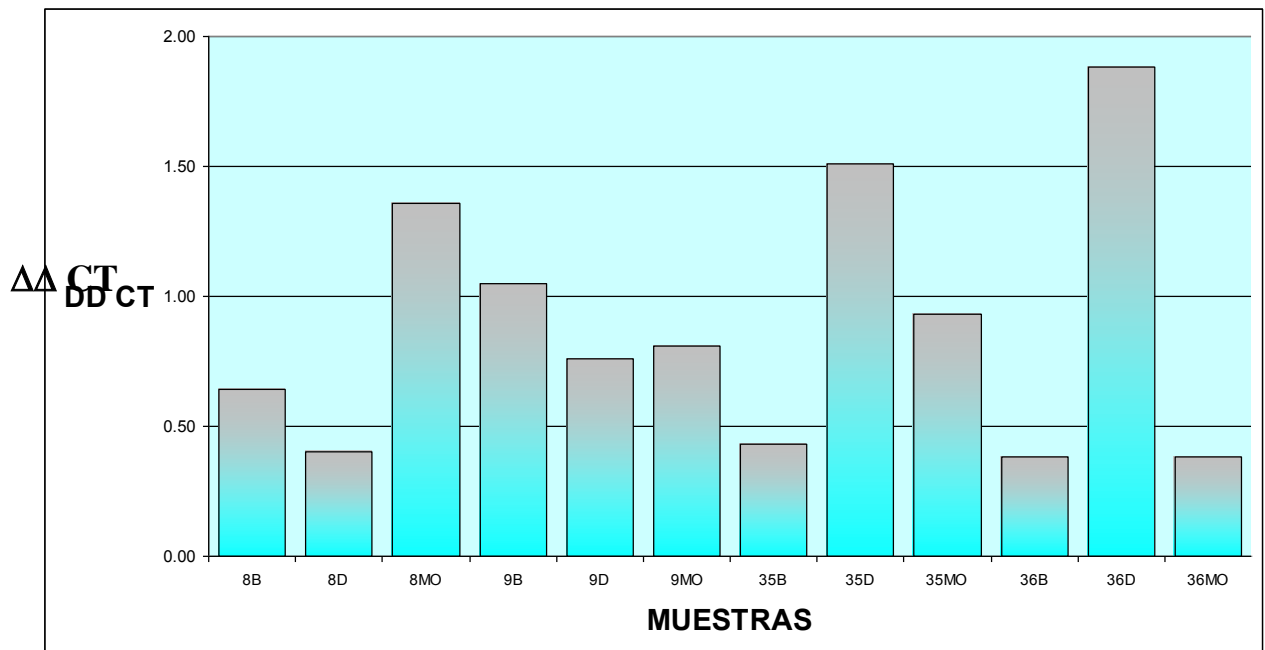
La muestra 2 es de las aves ligeras sin infección, las muestras 8 y 9 de aves ligeras infectadas con *Salmonella* Enteritidis. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

Normalización de la expresión de TLR4, TLR5 Y MyD88 con respecto a los individuos sin infección

TLR4

La expresión del TLR4 puede observarse en la figura 8. En las aves pesadas hay una sobreexpresión del gen en las muestras de duodeno, por la infección experimental por *Salmonella Enteritidis*. En los demás tejidos bazo y médula ósea hubo subexpresión de este gen. Sin embargo, en las aves ligeras sólo hubo una sobreexpresión en una muestra de médula ósea. Aunque todas las muestras presentan el gen, la intensidad de la expresión depende de cada individuo.

Figura 8. Normalización del gen TLR4 con respecto a las muestras de aves sin infección

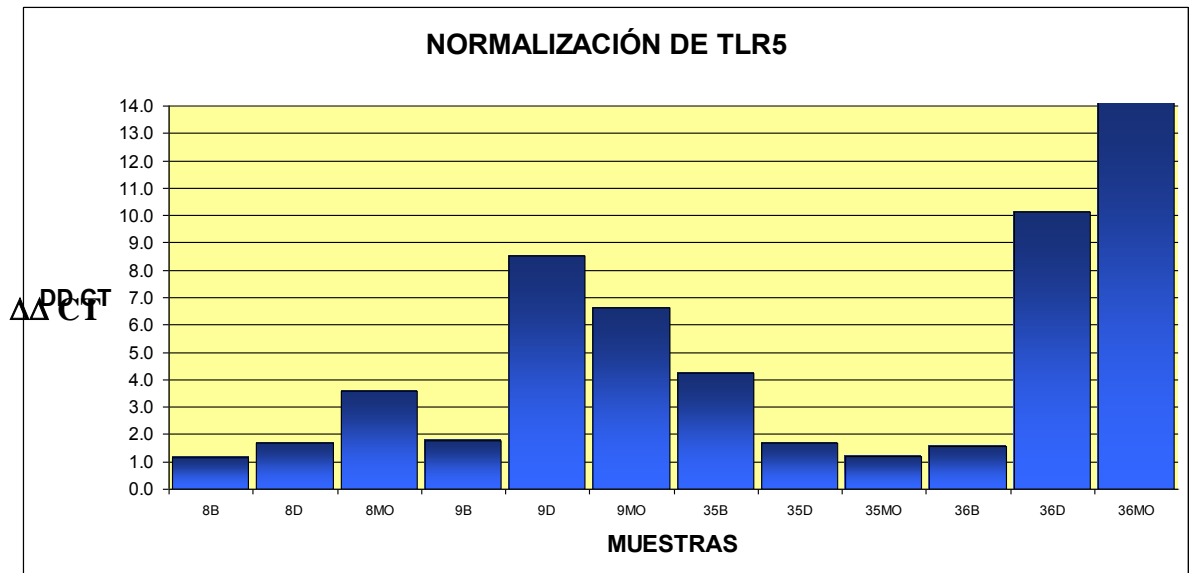


Las muestras 8 y 9 son muestras de aves ligeras, 35 y 36 de aves pesadas. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

TLR5

Para el caso de este gen hubo sobreexpresión en todas las muestras, en donde la expresión más alta fue en el duodeno y la más baja en el bazo de las aves ligeras. Para las aves pesadas el valor de $\Delta\Delta Ct$ más alto se observó en médula ósea y el más bajo en la otra ave en la médula ósea, como se observa en la figura 9.

Figura 9. Normalización del gen TLR5 con respecto a las muestras de aves

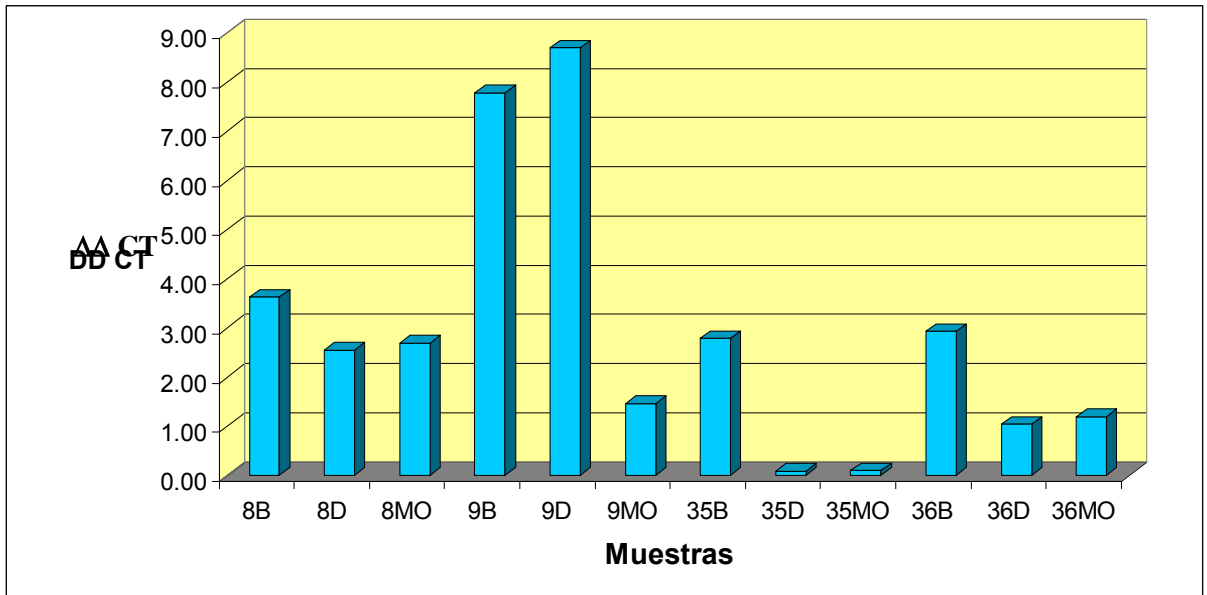


Las muestras 8 y 9 son muestras de aves ligeras, 35 y 36 de aves pesadas. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

MyD88

En la figura 10 se muestra sobreexpresión del MyD88 de todas las muestras en todas las aves. Se presentó mayor expresión en bazo y duodeno de las aves ligeras. En las aves pesadas, en bazo fue donde hubo sobreexpresión y en donde se presentó subexpresión fue en médula ósea y duodeno.

Figura 10. Normalización del gen MyD88 con respecto a las muestras de aves sin infección.



Las muestras 8 y 9 son muestras de aves ligeras, 35 y 36 de aves pesadas. Las muestras son bazo (B), duodeno (D) y médula ósea (MO).

Discusión

La expresión de genes en respuesta a infecciones bacterianas puede ser el resultado de muchos factores que modulan la cantidad y tiempo de llegada de la bacteria a cada tejido u órgano, estos factores pueden diferir entre individuos y líneas genéticas.^{2,20,23}

Los TLRs permiten detectar y diferenciar a la mayoría de los microorganismos patógenos. Las señales provenientes de los TLRs son importantes en la iniciación y sincronización adecuada de la respuesta inmune para mediar la inmunidad protectora.^{20,23}

El reconocimiento de la respuesta inmune innata contra *Salmonella* Enterica es mediado por los patrones moleculares asociados a patógenos, el TLR4 interacciona con el LPS, el TLR5 se activa con la flagelina, estos han sido informados en diferentes trabajos, en donde se describe su participación en la protección contra la infección sistémica hacia salmonelosis, tanto en humanos como en aves y por lo tanto se menciona una resistencia natural contra la salmonelosis sistémica.^{20,23}

El presente estudio se diseñó como un modelo experimental, con el fin de evaluar la expresión de los genes *TLR4*, *TLR5* y *MyD88* en aves. Las estirpes utilizadas presentaron una expresión basal de estos genes, se encontraron en las diferentes

muestras de los diferentes tejidos tales como: bazo, duodeno y médula ósea, de los pollos de engorda y de las aves ligeras.

TLR4

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, para el caso de *TLR4* este gen se expresó en bazo, duodeno y médula ósea de las aves de estirpe pesada, después de la infección experimental producida por *Salmonella* Enteritidis FT13 A y en las aves ligeras, lo que indica que este gen se encuentra presente en ambos fondos genéticos. Lo antes mencionado es similar con lo notificado con Ramasamy TK *et al.*, (2011), donde trabajaron con gallos nativos de la India, de la raza Aseel y Kadaknath, utilizando muestras de sangre para la realización de PCR en tiempo real, logrando observar la expresión de los genes TLR4 y TLR5. Concluyeron que la raza Kadaknath expresó niveles más altos de TLR4 que la raza Aseel. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el nivel de expresión del TLR5 entre las dos razas.⁴⁵

En otro estudio anterior, Ramasamy TK *et al.*, (2010), realizaron un proyecto con pollos nativos Assel, Kadaknath, cuello desnudo (*Naked neck*); pollos enanos (Dwarf) y White Leghorn- IWI de 36 semanas de edad. Se tomó sangre y después se realizó PCR en tiempo real, de los siguientes genes TLR3, TLR4, TLR 5 y TLR7, todos los heterófilos expresan una amplia gama de TLRs y estos reflejaron su principal papel como primera línea celular efectora. La raza Kadaknath mostró

niveles significativamente mayores de TLR4 y TLR5 con respecto a las otras razas que utilizó. Por lo tanto Ramasamy TK *et al.*, (2010), concluyó que la expresión de ARNm de los TLRs es diferente entre los pollos nativos y las otras razas de pollo.⁴⁶ Lo anterior es similar a los resultados del experimento en donde todas las aves expresaron el gen.

En el experimento de Nerren *et al.*, (2009), de pollos de 2 días de edad, se tomaron muestras de sangre. Se utilizó *Salmonella* Enteritidis (#97-11771) para la infección de los heterófilos a una relación de 20 bacterias: 1 heterófilo. Después de la infección experimental, se realizó la PCR en tiempo real, obteniendo un incremento de la expresión de TLR4 seguida de la estimulación con *Salmonella* Enteritidis.²⁷ En el presente trabajo, en las aves de ligeras se observó sobreexpresión en médula ósea y en bazo. En las aves pesadas hubo sobreexpresión en duodeno.

Un trabajo similar fue el de Abasht *et al.*, 2008, utilizó una línea consanguínea de pollo de engorda originaria de una línea de machos reproductores pesados y 2 líneas muy puras, Leghorn G-B2 y Fayoumi M línea 15.2. Se realizó qRT-PCR a partir de bazo y ciego. El bazo los pollos Fayoumi tuvieron los niveles más altos de expresión de ARNm del *TLR4* que en las aves Leghorn y el nivel de expresión en los pollos de engorda fue intermedio, obteniendo valores de $\Delta\Delta Ct$ de 10.92, 12.65 y 13.18, en Leghorn, pollo de engorda y Fayoumi respectivamente. Un hallazgo

importante es que el nivel de expresión de ARNm del *TLR4* fue aumentando en Fayoumis y disminuyendo en Leghorn después de la inoculación con *Salmonella* Enteritidis. En los pollos de engorda, el nivel de expresión de ARNm del *TLR4* fue incrementando después de la inoculación con *Salmonella* Enteritidis. En el presente estudio no hubo sobreexpresión del TLR4 como en el estudio de Abasth *et al.*, (2008), pero en otro estudio realizado por Abasth *et al.*, (2009), no obtuvo diferencia significativa en el nivel de expresión de *TLR4* en el bazo de las aves inoculadas. Sin embargo, en las aves inoculadas con *Salmonella* Enteritidis el nivel de expresión de ARNm del *TLR4* fue significativamente más alto a las 18 horas que a las 2 horas PI. ⁴⁷

En este estudio el *TLR4*, estuvo sobreexpresado en el duodeno de los pollos de engorda y en la médula ósea de las aves ligeras y subexpresado en los otros tejidos. En los resultados de Higgs *et al.*, (2006), mencionan que la expresión del *TLR4* puede ser estirpe específica, como en los pollos White Leghorn, en donde las investigaciones sugieren que en estas estirpes la expresión del *TLR4* es mucho más fuerte, de manera contraria a lo encontrado en este estudio, donde el nivel de expresión del TLR4 en la estirpe pesada (pollo de engorda) fue mayor en comparación de las estirpes ligeras. ¹⁹

TLR5

En el presente estudio, los resultados de este TLR muestran que fue sobreexpresado en todos los órganos. En las muestras de las aves ligeras hubo una subexpresión en los diferentes tejidos a diferencia del pollo de engorda, donde hubo sobreexpresión del gen.

También Ramasamy *et al.*, (2010), observó que la expresión del *TLR5* fue comparativamente más alta que los otros TLRs en todas las razas de pollos nativos de la India: Assel, Kadaknath, además la raza Cuello desnudo (*Naked neck*), pollos Enanos (*Dwarf*) y White Leghorn- IWI de 36 semanas de edad.⁴⁶

Los resultados de Abasht en 2009, coinciden con los obtenidos en este trabajo, donde Abasht observó en el caso de *TLR5* que el nivel de expresión fue más alto en pollo de engorda inoculado con *Salmonella* Enteritidis, en contraste con las aves Leghorn y Fayoumi, en donde no hubo variación de la expresión entre ellas.⁴⁷

En el trabajo de Higgs *et al.*, (2006), usó pollos de engorda, inoculados con *Salmonella* Typhimurium cepa SL1344, donde determinó la expresión de TLR2, TLR4, TLR5 y TLR15, observando que el *TLR5* se expresó intensamente tanto en bazo como en médula ósea de los 7 tejidos de los pollos de engorda que examinó, la transcripción de estos TLRs fue abundante en la médula ósea y en la bolsa de

Fabricio, las cuales no están asociadas con la función primaria de defensa pero si con el desarrollo linfoide. Los niveles de expresión de estos *TLRs* fueron ligeramente inferiores en el bazo, el cual tiene una función inmunológica primaria. Sin embargo, los niveles de expresión de estos *TLRs*, fueron menos abundantes en el hígado, en el intestino delgado, en la lengua y en el ciego.¹⁹

He *et al.*, 2006, usó monocitos a partir de sangre de aves de 2 y 3 días de edad, estudiaron *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6*, *TLR7*, estimularon los diferentes *TLRs* con sus ligandos correspondientes. Los monocitos de los pollos jóvenes expresaron; *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6* y *TLR7*. El *TLR5* no fue detectado en los monocitos, indicando que este receptor esta restringido a ciertos tipos de células.⁵⁰ Los monocitos no son capaces de expresar al *TLR5*, sin embargo los tejidos usados en este estudio bazo, duodeno y medula ósea si lo expresaron.

Los resultados del trabajo de Iqbal *et al.*, (2005), demostraron niveles muy bajos en la expresión de *TLR5* en pollos White Leghorn usando un método semi-cuantitativo de PCR. La expresión más alta de *TLR5* la observó en la raza Kadaknath, con lo que se concluyó que la expresión del gen, puede proveer de una mejor protección contra bacterias que tienen flagelos como su mayor componente antigénico.⁴⁸ Lo anterior es parecido a los resultado obtenidos en este presente trabajo, donde la mayor expresión de *TLR5* fue en las aves pesadas en comparación con las aves ligeras.

Iqbal *et al.*, (2005a), descubrió que posterior al tiempo de la infección, el nivel de expresión de *TLR5*, fue disminuyendo consistentemente en el bazo de las tres líneas de pollos después de la infección con *Salmonella* Enteritidis, comparado con los pollos no inoculados .⁴⁸ En el presente trabajo sólo se midió en una sola ocasión, pero en el bazo la expresión de TLR5 al igual que los demás tejidos.

En el trabajo de Iqbal *et al.*, (2005b), usó aves de la estirpe White Leghorn y Rhode Island y distintas muestras (bazo, hígado, tonsilas cecales e intestino delgado) a diferentes tiempos (a las 0, 9, 24 y 48 horas), en las aves de 8 semanas de edad, previamente inoculadas con una cepa silvestre de *Salmonella* Typhimurium F98 y observó mediante PCR en tiempo real, que el gen TLR5 se encontraba subexpresado en el riñón e hígado y sobreexpresado en bazo e intestino.⁴⁹ En el presente trabajo también se obtuvo una sobreexpresión de TLR5 en todas las muestras tanto de aves de pesadas como en aves ligeras.

TLR 4 Y TLR5

Los genes *TLR4* y *TLR5* se expresan de manera constitutiva y puede modificarse su expresión cuando se presenta una infección por microorganismos que tienen en su composición LPS y flagelina respectivamente. Por ejemplo, el género *Salmonella* presenta estos dos *PAMPs*, activando la cascada de señalización de los *TLRs* y con ello activa la respuesta inmune. En el presente trabajo se

encontraron ambos TLRs tanto en aves pesadas como en aves ligeras con diferentes niveles de expresión entre ellos.

En el trabajo de Yilmaz et al., (2009), usando una mutación del TLR5 determinaron que esta mutación, puede dar como resultado la duplicación de genes y así se pueden mantener o perder la función original. La duplicación de los genes de los TLRs ocurre tanto en aves como en mamíferos y algunos genes están bajo una selección positiva, la cual juega un papel importante en la evolución de nuevos genes, por lo que la ganancia o pérdida de genes puede ser benéfica o algunas veces perjudicial para el hospedero, sobre todo en el caso de genes que intervienen en la defensa del organismo ante los agentes patógenos y con ello evitar la presentación de la enfermedad.⁵³

En el experimento realizado por Abasht *et al.*, (2008), utilizó dos líneas entrecruzadas de un macho de pollo de engorda con un Leghorn (G-B2) y con líneas de Fayoumi (M 1.52). Los pollos de un día de edad, fueron infectados con *Salmonella* Enteritidis, después de 7 y 8 días de edad se tomaron asépticamente el bazo y el ciego. Posteriormente se realizó la RT-PCR. Los resultados obtenidos mostraron que el nivel de expresión del ARN para los genes *TLR2* y *TLR4*, incrementaron su nivel de expresión de 2.3 veces para el TLR2 y de 5.5 veces para el TLR4 y disminuyó 6.4 veces para el TLR5. Con relación al nivel de expresión en el ciego del gene TLR4 fue significativamente más alto a los 8 días que a los 7 días tiempo PI, no así con TLR2 ni TLR5, por lo tanto la infección

producida con *Salmonella* Enteritidis incrementó 2.1 veces el nivel de expresión de TLR4, pero no hay efecto significativo en el nivel de expresión en el bazo para TLR2 y ni para TLR5.⁵¹ En el presente estudio aunque no se utilizó el TLR2, se observó que el TLR4 fue menor la expresión que en el TLR5 donde la expresión es mayor en los mismos órganos.

De los genes que se estudiaron en este proyecto, el TLR5 tuvo una mayor expresión en comparación con el *TLR4*. Sobre todo en las aves ligeras, por que los pollos de engorda tuvieron mayor sobreexpresión del TLR5.

Kogut et al., (2006), utilizaron heterófilos de aves Leghorn (Hy-line W36) de un día de edad. Para que los TLRs se expresaran, se estimularon a los heterófilos con sus agonistas correspondientes, para el caso de TLR4 se utilizó LPS ultra puro de *Salmonella* Minesota y para el TLR5 se utilizó flagelina (FLG) de *Salmonella* Typhimurium, entre otros, luego se realizó la extracción del ARN y posteriormente se llevó a cabo la RT-PCR. Los heterófilos expresaron constitutivamente los TLRs (1, 6,10), el TLR2 tipo1 y 2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR7. El gen TLR9 no pudo ser encontrado en el *Gallus gallus*.⁵² Por lo que además de los tejidos utilizados en este trabajo se pueden usar también heterófilos de aves infectadas para determinar TLRs en aves.

Iqbal et al., (2005a), en los tejidos de su estudio determinó los TLR1, TLR2-1 y TLR2-2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 y encontró que se expresaron en la mayoría de

los tejidos. En el caso de TLR4 se expresó en: duodeno, yeyuno, ileon, ciegos, colon, timo, bazo, tonsilas cecales, bolsa de Fabricio, pulmón, hígado, riñón, cerebro, testículos, corazón, médula ósea. El TLR5 se expresó en todos los órganos en los que se expresó TLR4, pero también en músculo y piel. La conclusión de ese estudio representa una importante contribución a la comprensión de la inducción de la respuesta inmune aviar y los procesos de la enfermedad, que ayudará a la formulación de estrategias de intervención inmunológicas racionales en aves.⁴⁸ Los resultados de este trabajo, coinciden con los de Iqbal *et al.*, (2005), en donde se observó que los TLRs están presentes en ambos fondos genéticos y pueden ayudar a prevenir la presentación de la enfermedad de *Salmonella* en aves en edad temprana.

MyD88

MyD88 es una proteína adaptadora, que participa en la señalización intracelular y ayuda a la inducción de la producción de citocinas inflamatorias después de que se une a TLR4 o TLR5.

Basado en la literatura y en los hallazgos de diferentes trabajos no siempre se logra la activación de la respuesta inmune, depende también de las moléculas adaptadoras que activan la cascada de señalización para que la respuesta se desarrolle adecuadamente, de lo contrario el tejido es invadido por los microorganismos. Por lo anterior, no es posible aislar el agente de todos los

tejidos o no siempre en el mismo tiempo post infección, además de que también depende del agente que afecte al individuo.

En el trabajo de Nerren *et al.*, 2009 y específicamente en el caso de la proteína adaptadora MyD88, el nivel de expresión fue igual tanto en la línea A como en la línea B y no hubo diferencia significativa entre las líneas, ni en los niveles de expresión de ARNm para MyD88 en las aves no infectadas ni en las aves infectadas con *Salmonella* Enteritidis.²⁷ Al igual que los resultados del presente trabajo, no hubo diferencias en la expresión de este iniciador, ambas estirpes lo sobreexpresaron.

En un caso diferente y con otro microorganismo Lu *et al.*,(2009), usando *Clostridium perfringens* en pollos de engorda de la estirpe Ross x Ross de 1 día de edad, comparó la expresión desde el día cero, día 1, día 2 y el día 4 (D0,D1,D2, D4) , de las siguientes moléculas adaptadoras: MyD88 (gen (88) de diferenciación mielóide), MAL (adaptador tipo MyD88 del inglés Mal (MyD88-adapter-like), TRAF6, TRIF (Dominio TIR que contiene el adaptador que induce INF- β , del inglés TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)), IRF3 (factor regulador de interferon 3) y RIP-1 (Proteína 1 de interacción con el receptor), en el bazo después de los días del experimento y obtuvieron una disminución en la expresión en IRF3 en los días D2 y D4 (PI). En el íleon el nivel de expresión de MyD88, TRAF6 y TRIF se incrementó del día D2 al D4 PI. Por lo que MyD88 también se expresa en diferentes días post infección, además en otros tipos de

infecciones como *Clostridium* o como en este trabajo que se realizó con *Salmonella*.⁵⁴

Conclusiones

En este trabajo el TLR4 y el TLR5 se encontraron de manera constitutiva en los órganos estudiados y tuvieron sobreexpresión al estar en contacto con *Salmonella* en las aves infectadas experimentalmente. MyD88 se expresó tanto en aves ligeras como en aves pesadas, posterior a la infección *Salmonella*, sugiriendo una participación en la activación de la respuesta inmune.

En este trabajo se pudo observar que la expresión de los TLR4 y TLR5 así como de MyD88 en aves ligeras es más rápida que en las aves pesadas, sugiriendo que esa es una de las razones por las cuales se dice que las aves ligeras son más resistentes a la infección por *Salmonella*, por el contrario, en las aves pesadas, la expresión de los TLR's y de MyD88 descritos anteriormente, es más tardía, provocando que *Salmonella* invada los tejidos antes de la respuesta inmunológica y por consecuencia enferma.

Este trabajo junto con los trabajos de otros investigadores, ayudan a comprender mejor el sistema inmunológico en las aves, desafortunadamente esta área se ha descuidado al tratar de mejorar la producción en las dos líneas genéticas de este estudio.

Si se logra mejorar el sistema inmunológico en las aves, se podría disminuir la incidencia de las enfermedades infecciosas y a su vez la disminución de las

enfermedades transmitidas por los alimentos en el humano, derivado del consumo de productos avícolas, además de aumentar la producción de carne y huevo.

Este estudio contribuye al campo de la inmunología y así como se demostró la expresión de TLR y así poder lograr crear estirpes genéticamente resistentes a *Salmonella*.

Se sugiere la realización de más estudios en el ámbito molecular, como PCR en tiempo real, para encontrar la correlación de los niveles de expresión de los *TLRs* con la resistencia o susceptibilidad a los diferentes patógenos que afecta a la avicultura.

Literatura citada

1. RABSCH W, Tschape H and Baumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect* 2001; 3:237–247.
2. LEVEQUE G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredó-Ostí JC, Morgan K, Malo D. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella* enterica serovar typhimurium infection in chickens. *Infect Immun* 2003; 71:116–1124.
3. ABASHT B, Kaiser M.G., Lamont S.J. Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2008; 123: 314–323.
4. GUTIÉRREZ-COGCO, L., Montiel-Vázquez, L., Aguilera-Perez, P. y González-Andrade, M.C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Salud Pública de México*. 2000 42: 490-495.
5. MEAD P S, Slutsker L, Dietz V., McCaig L. F, Bresee J S, Shapiro C, Griffin P M, and Tauxe R V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999;5: 607–625.
6. LYNCH M, Painter J, Woodruff R, Braden C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1998–2002. *MMWR Surveill. Summ.* 2006.; 55: 1–42.
7. GAST RK, Guard-Bouldin J, Holt PS. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. *Avian Dis.* 2005; 49: 382–386.
8. GAST RK, Guraya R, Guard-Bouldin J, Holt PS, Moore RW. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* enteritidis or *Salmonella* heidelberg. *Avian Dis.* 2007; 51: 40–44.
9. SMITH DP, Cason JA, Berrang ME. Effect of fecal contamination and cross-contamination on numbers of coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on immersion-chilled broiler carcasses. *J. Food Prot.* 2005: 68; 1340–1345.
10. BUMSTEAD N and Barrow PA. Genetics of resistance to *Salmonella*

- Typhimurium in newly hatched chicks. Br. Poult. Sci. 1988; 29; 521–529.
11. BUMSTEAD N and Barrow PA. Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. Avian Dis. 1993; 37;189–193.
 12. BARROW PA, Huggins M B, Lovell M A, and Simpson J M. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. Res. Vet. Sci. 1987; 42;194–199.
 13. GUTIÉRREZ PJÁ. Inmunología Veterinaria. Manual Moderno, 2010, pp. 21-22
 14. CORMICAN P, Meade KG, Cahalane S, Narciandi F, Chapwanya A, Lloyd AT, et al. Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine beta-defensins. Immunogenetics 2008; (3-4): 147 - 56.
 15. BOYD A, Philbin VJ, Smith AL. Conserved and distinct aspects of the avian Toll-like receptor (TLR) system: implications for transmission and control of bird borne zoonoses. Biochem. Soc. Trans. 2007; 35:1504–1507.
 16. MICHAILEDIS G, Theodoridis A, Avdi M. Effects of sexual maturation and *Salmonella* infection on the expression of Toll-like receptors in the chicken vagina. Anim Reprod Sci. 2011;123(3-4):234-41.
 17. MACKINNON KM, He H, Nerren JR, Swaggerty CL, Genovese KJ, Kogut MH. Expression profile of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella* Enteritidis-infected broiler chickens. Vet Microbiol 2009; 137: 313–319.
 18. BAR-SHIRA E, Sklan D, Friedman A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. Dev. Comp. Immunol 2003; 27: 147–157.
 19. HIGGS R, Cormican P, Cahalane S, Allan B, Lloyd AT, Meade K, James T, Lynn DJ, Babiuk LA, O'Farrelly C. Induction of a novel chicken toll-like receptor following *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection. Infect. Immun. 2006; 74: 1692–1698.
 20. FUKUI A, Inoue N, Matsumoto M, Nomura M, Yamada K, Matsuda Y, Toyoshima K, Seya T. Molecular cloning and functional characterization of chicken Toll-like receptors. A single chicken Toll covers multiple molecular patterns. J Biol Chem 2001; 276: 47143–47149.

21. KAISER P. The avian immune genome—a glass half-full or halfempty? *Immunol* 2007; 117:221–230.
22. PHILBIN VJ, Iqbal M, Boyd Y, Goodchild MJ, Beal RK, Bumstead N, Young J, Smith AL. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR 8 in chickens. *Immunology* 2005; 114: 507– 521.
23. MACKINNON KM, He H, Nerren JR, Swaggerty CL, Genovese KJ, Kogut MH. Expression profile of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella* Enteritidis-infected broiler chickens. *Vet Microbiol* 2009; 137: 313–319.
24. HIGUCHI M, Matsuo A, Shingai M, Shida K, Ishii A, Funami K, Suzuki Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken toll-like receptor 2 subfamily. *Dev Comp Immunol* 2008; 32: 147–155.
25. SCHWARZ H, Schneider K, Ohnemus A, Lavric M, Kothlow S, Bauer S, Kaspers B, Staeheli P. Chicken toll-like receptor 3 recognizes its cognate ligand when ectopically expressed in human cells. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 27: 97–101.
26. WERLING D, Coffey TJ. Pattern recognition receptors in companion and farm animals—the key to unlocking the door to animal disease? *Vet J* 2007;174: 240–251.
27. NERREN JR, Swaggerty CL, MacKinnon KM, Genovese KJ, He H, Pevzner I, Kogut MH. Differential mRNA expression of the avian-specific toll-like receptor 15 between heterophils from *Salmonella*-susceptible and -resistant chickens. *Immunogenetics*. 2009; 61(1):71-77.
28. BOYD A, Philbin VJ, Smith AL. Conserved and distinct aspects of the avian Toll-like receptor (TLR) system: implications for transmission and control of bird borne zoonoses. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35:1504–1507.
29. DUNNE A, O'Neill LA. Adaptor usage and toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 2005; 579:3330–3335.
30. LEENDERTSE M, Willems RJL, Giebelen IAJ, van den Pangaart PS, Wiersinga WJ, de Vos AF, Florquin S, Bonten MJM, van der Poll T. TLR2-dependent MyD88 signaling contributes to

- early host defense in murine *Enterococcus faecium* peritonitis. *J Immunol* 2008; 180:4865–4874.
31. TAKEDA K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16 (1) 3–9.
 32. BIRCHLER T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, et al. Human Toll- like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J i mmunol* 2001; 31 (11): 3131-7.
 33. WU M, Maier E, Benz R, Hancock RE. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999; 38 (22): 7235-42.
 34. BALS R, Wilson JM. Cathelicidins-a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60 (4):711-20.
 35. YANG D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins; linking innate and adaptative immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 283(5439):525-8.
 36. LI X, Swaggerty CL, Kogut MH, Chiang H, Wang Y, Genovese KJ, He H, Stern NJ, Pevzner IY, Zhou H. The paternal effect of *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Poult Sci* 2008;87;1742–1747.
 37. SWAGGERTY CL, Pevzner IY, Ferro PJ, Crippen TL, Kogut MH. Association between in vitro heterophil function and the feathering gene in commercial broiler chickens. *Avian Pathol* 2003; 32; 483–488.
 38. SWAGGERTY CL, Ferro PJ, Pevzner IY, Kogut MH. Heterophils are associated with resistant to systemic *Salmonella* Enteritidis infections in genetically distinct chicken lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004a: 43; 149–154.
 39. SWAGGERTY CL, Kogut MH, Ferro PJ, Rothwell L, Pevzner IY, Kaiser P. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from *Salmonella*-resistant and -susceptible chickens. *Immunol* 2004b: 113;139–148.
 40. SWAGGERTY CL, Lowry VK, Ferro PJ, Pevzner IY, Kogut MH. Disparity in susceptibility to

- vancomycin-resistant *Enterococcus* organ invasion in commercial broiler chickens that differ in innate immune responsiveness. *Food Agric Immunol* 2005;16:1–1.
41. SWAGGERTY CL, Kaiser P, Rothwell L, Pvezner IY, Kogut MH. Heterophil cytokine mRNA profiles from genetically distinct lines of chickens with differential heterophil-mediated innate immune responses. *Avian Pathol* 2006; 35:102–108.
 42. KOGUT MH, Swaggerty CL, He H, Pevzner I, Kaiser P. Toll-like receptor agonists stimulate differential functional activation and cytokine and chemokine gene expression in heterophils isolated from chickens with differential innate responses. *Microbes Infect* 2006; 8:1866–1874.
 43. MACKINNON KM, He H, Nerren JR, Swaggerty CL, Genovese KJ, Kogut MH. Expression profile of toll-like receptors within the gastrointestinal tract of 2-day-old *Salmonella* Enteritidis-infected broiler chickens. *Vet Microbiol* 2009; 137: 313–319.
 44. COLEMAN, WB y Tsongalis, GJ. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Humana Press. ISBN 1-58829-356-4 2006; 47-56 y 65-74.
 45. RAMASAMY TK, Reddy RM, Murugesan S. Toll-like receptor mRNA expresión, iNOS gene polymorphismo and serum nitric oxide levels in indigenous chickens, *Vet Res Commun*. 2011; 35: 321 – 327.
 46. RAMASAMY KT; Reddy MR; Dhunutha NR, Murugesan S, Chatterjee RN, Ullengala R, Haunshi S. Differential expression of Toll like receptor mRNA in White Leghorn and indigenous chicken of India, *Vet Res Commun*. 2010; 34: 633-639.
 47. ABASHT B, Kaiser MG, van der Poel J, Lamont SJ. Genetic lines differ in Toll –like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poultry Science*. 2009; 88:744-749.
 48. IQBAL M, Philbin JV, Smith LA. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005; 104: 117–127.
 49. IQBAL M, Philbin VJ, Withanage GS, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd Y, Smith AL. Identification and functional characterization of chicken Toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of

- infection with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. Infect Immun 2005; 73:2344–2350.
50. HE H, Genovese KJ, Nisbet DJ, Kogut MH. Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by toll-like receptor agonists in chicken monocytes. Molecular Immunology. 2006; 43: 783-789.
 51. ABASHT B, Kaiser M.G., Lamont S.J. Toll-like receptor gene expression in cecum and spleen of advanced intercross line chicks infected with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. Vet. Immunol. Immunopathol 2008; 123: 314–323.
 52. KOGUT MH, Iqbal M, He H, Philbin VJ, Kaiser P, Smith A. Expression and function of Toll like receptors in chicken heterophils. Dev Comp Immunol. 2005; 29: 791-807.
 53. YILMAZ A, Shen S, Adelson DL, Xavier S, Zhu JJ. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. Immunogenetics 2005; 56:743–753.
 54. LU Y, Sarson AJ, Gong J, Zhou Huaijun, Zhu W, Kang Z, Yu H, Shayan S, Han Y. Expression profiles of genes in Toll-like Receptor-mediated Signaling of broilers infected with *Clostridium perfringens*. Clin. Vaccine Immunol.. 2009;16: 1639-1647.