



11674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS EN LINFOMAS DE
GALLINAS REPRODUCTORAS CON LA ENFERMEDAD
DE MAREK, TRATADAS CON CASIOPEÍNA[®] III-IA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
JAVIER DARÍO CALDERÓN DURANTE

TUTOR: M.V.Z. VÍCTOR MANUEL PETRONE
COMITÉ TUTORAL: M.V.Z. FERNANDO CONSTANTINO
BIOL. ISABEL GARCÍA

MÉXICO, D. F.

2005



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.

ÍNDICE

| Tema | Página |
|--------------------------------------------------------|---------------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Neoplasia | 1 |
| 1.2. Enfermedades neoplásicas de las aves | 1 |
| 1.3. Enfermedad de Marek | 2 |
| 1.3.1. Etiología | 2 |
| 1.3.2. Genes del VEM relacionados con la oncogenicidad | 2 |
| 1.3.3. Transmisión | 4 |
| 1.3.4. Periodo de incubación | 4 |
| 1.3.5. Tipos de infección | 5 |
| 1.3.6. Patogenia | 6 |
| 1.3.7. Signos clínicos | 7 |
| 1.3.8. Hallazgos macroscópicos | 8 |
| 1.3.9. Histología | 8 |
| 1.4. Cáncer en humanos | 9 |
| 1.4.1. Situación epidemiológica del Cáncer en México | 9 |
| 1.4.2. Mortalidad por Cáncer | 10 |
| 1.4.3. Linfoma en humanos | 10 |
| 1.4.3.1. Enfermedad de Hodgkin | 11 |
| 1.4.3.2. Linfomas no Hodgkin | 12 |
| 1.5. Apoptosis | 14 |
| 1.5.1. Regulación de la apoptosis | 17 |
| 1.6. Casiopeínas | 18 |
| 2. Justificación | 19 |
| 3. Hipótesis | 20 |
| 3. Objetivos | 20 |
| 4.1. Objetivo general | 20 |

| | | |
|--------|--------------------------|----|
| 4.2. | Objetivos específicos | 20 |
| 5. | Materiales y métodos | 21 |
| 5.1. | Animales | 21 |
| 5.2. | Tratamiento | 21 |
| 5.3. | Muestras | 21 |
| 5.4. | Índice mitótico | 22 |
| 5.5. | Inmunohistoquímica | 22 |
| 5.6. | Índice apoptótico | 23 |
| 5.7. | Análisis estadístico | 23 |
| 6. | Resultados | 24 |
| 6.1. | Necropsia | 24 |
| 6.2. | Histopatología | 24 |
| 6.2.1. | Descripción microscópica | 25 |
| 6.2.2. | Diagnóstico morfológico | 28 |
| 6.3. | Inmunohistoquímica | 29 |
| 6.4. | TUNEL | 29 |
| 7. | Discusión | 30 |
| 8. | Bibliografía | 34 |

| | |
|---------|-------------------------------------|
| Anexo A | Dosis letal 50 |
| Anexo B | Procedimiento hematoxilina y eosina |
| Anexo C | Procedimiento inmunohistoquímica |
| Anexo D | Procedimiento TUNEL |
| Anexo E | Cuadros |
| Anexo F | Figuras |

Resumen

Con el objeto de evaluar la capacidad de la Casiopeína[®] III-ia para inducir apoptosis en linfomas de gallinas con la Enfermedad de Marek (EM) se seleccionaron aleatoriamente 40 gallinas de una granja diagnosticada con la EM. Los individuos del grupo tratado (n=20) recibió una dosis de 0.25mg/kg por vía endovenosa los días uno, cinco y nueve. El día 13 todas las aves fueron sacrificadas y se les realizó necropsia. Se tomaron muestras de hígado, proventrículo, bazo, riñón, corazón, pulmón, nervio, encéfalo, ovario, mesenterio e intestino y se fijaron en formalina al 10%. Posteriormente, se procesaron las muestras para la tinción con hematoxilina y eosina (HE). En los linfomas de los tejidos de los animales tratados y testigos, se determinó el índice mitótico, el índice de activación de caspasa 3 por medio de inmunohistoquímica y el índice de fragmentos de DNA 3'OH mediante TUNEL. Se compararon los resultados por medio de la prueba de *t* de Student. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como indicativo de una relación significativamente estadística. Los resultados muestran que bajo el protocolo usado en este estudio no hay diferencias estadísticamente significativas en los índices mitóticos, de activación de caspasa 3 y de fragmentos de DNA 3'OH de los grupos tratado y testigo, lo que sugiere que la muerte celular inducida por la Casiopeína[®] III-ia no se realiza mediante vías dependientes o independientes de caspasas al interior de la célula transformada en el caso de la EM.

Palabras clave: neoplasia, apoptosis, linfoma, casiopeína

Abstract

In order to evaluate the capacity of Casiopeina[®] III-ia to induce apoptosis in lymphomas of chickens with Marek's Disease, 40 chicken from a farm with Marek's Disease were selected. The experimental group received 0.25mg/kg IV the days one, five and nine. The 13th day all the chicken were sacrificed and samples from liver, proventriculus, spleen, kidney, heart, lung, nerve, brain, ovary, mesentery and intestine and were fixed in formaline 10%. The sections were dye with hematoxiline and eosine. In the lymphomas of the groups experimental and control were determined the mitotic index, the index of activation of caspasa 3 by immunohistochemistry and the index of fragments of DNA 3'OH by TUNEL. The results were compared by the Student's *t* test. A *P*-value <0.05 was prospectively defined as indicating a statically significant relationship. There were no significant differences between the mitotic and apoptotic indexes of the experimental and control group, which suggest that the cellular death induced by the Casiopeina[®] III-ia in transformed cells of the Marek's disease, is not induced by caspase-dependent or caspase-independent mechanisms.

Key words: neoplasm, apoptosis, lymphoma, casiopeina

Evaluación de la apoptosis en linfomas de gallinas reproductoras con la enfermedad de Marek, tratadas con Casiopeína® III-ia

1. Introducción

1.1. Neoplasia

En 1952 el oncólogo británico Sir Ruppert Willis¹ definió a la neoplasia como una masa anormal de tejido, con un crecimiento que sobrepasa al de los tejidos normales y no coordinado con el de éstos, que conserva el mismo carácter excesivo una vez concluido el estímulo que provocó el cambio. Actualmente se ha observado que además de lo anotado, la neoplasia ataca al hospedador al competir con las células normales por el suministro de energía y nutrientes. Para referirse a una neoplasia también se ha usado el término de tumor que a pesar de que en un principio se refería al aumento de tamaño ocasionado por un proceso inflamatorio ahora se entienden como sinónimos. Por otra parte la palabra cáncer se ha adoptado para denominar a las neoplasias malignas y aunque no se conoce con certeza su origen probablemente derive de la palabra latina para cangrejo debido a que la neoplasia se adhiere al tejido con la misma obstinación que el cangrejo a todo lo que se agarra².

1.2. Enfermedades Neoplásicas en aves

Dentro de este grupo se incluyen enfermedades que se tienen o no un agente etiológico conocido. Las principales, por las pérdidas económicas que ocasionan, son la enfermedad de Marek (EM), la leucosis aviar y la reticuloendoteliosis que son causadas por agentes virales. Los tumores de etiología desconocida incluyen una amplia variedad de neoplasias benignas y malignas derivadas de tejidos muscular, epitelial, nervioso, membranas serosas y células de pigmentación³.

1.3. Enfermedad de Marek

El primer reporte de esta enfermedad se hizo en 1907 cuando se observó parálisis en pollos que se acompañaba de infiltración mononuclear en los nervios periféricos y la médula espinal⁴. Posteriormente en 1914 la enfermedad fue diagnosticada en los Estados Unidos de América (EUA), así como en Holanda y Gran Bretaña⁵.

1.3.1. Etiología

El virus de la enfermedad de Marek (VEM) es un Herpesvirus con propiedades linfotrópicas similares a las presentadas por los gamma Herpesvirus⁶, sin embargo, su estructura molecular y su organización genómica es similar a la de los alfa herpesvirus⁷. De acuerdo a su antigenicidad se han identificado tres serotipos. El VEM de baja y alta virulencia y las cepas atenuadas fueron denominadas serotipo 1. Los dos grupos adicionales de herpesvirus no oncogénicos fueron aislados a partir de pollos y pavos y se denominan serotipos 2 y 3 respectivamente^{8,9}.

1.3.2. Genes del VEM relacionados con la oncogenicidad

Familia de genes *BamHI-H*

Es una región de transcripción activa y se ha sugerido que la pérdida de oncogenicidad está asociada con la expresión de 132-bp que se da en esta familia de genes. También se ha encontrado la participación de esta región en la determinación de líneas celulares linfoblastoides derivadas del VEM¹⁰.

Complejo fosfoproteína 38 (pp38)

Las células linfoblastoides expresan un número bajo pero variable de proteínas fosforiladas de 41, 38 y 24 kDa lo que sugiere su potencial

participación en la oncogénesis¹¹. Sin embargo, pp38 también es expresada por cepas atenuadas del serotipo 1, lo que descarta un papel directo en la oncogénesis. Los serotipos 2 y 3 también expresan proteínas homólogas a la pp38 con alteraciones en la secuencia N terminal¹². Se han encontrado niveles altos de pp38 durante la etapa citolítica temprana de la infección, así como en el epitelio del folículo plumoso infectado¹³. Sin embargo, su expresión se restringe a un pequeño porcentaje de líneas de células linfoblastoides y linfomas inducidos por el VEM¹⁴, sugiriendo que pp38 puede estar más asociado a la infección lítica que a la transformación. A pesar de esto, no se puede descartar la participación de estas proteínas en la oncogenicidad o el mantenimiento del estado de transformación¹⁵.

Proteína de célula infectada 4 (ICP 4)

ICP4 funciona como un activador mayor de varios genes tempranos y tardíos¹⁶, incluyendo la expresión de pp38 en células linfoblastoides¹⁷. No se ha podido probar su participación durante latencia y transformación. La inhibición de la transcripción relacionada a ICP 4 en células infectadas en latencia y linfoblastoides sugiere que este gen juega un papel importante en latencia y transformación de células infectadas por el VEM¹⁸.

Gen EcoRI-Q (Meq)

Sólo se encuentra en las cepas oncogénicas del VEM^{19,20}. Codifica para una proteína de 339 aminoácidos. Debido a que es altamente expresado en tumores inducidos por el VEM y células linfoblásticas se considera como un importante candidato a gen transformador²¹. Esto se encuentra apoyado en el hecho de que Meq puede bloquear apoptosis²². Aun se desconoce el mecanismo exacto por el cual Meq induce oncogénesis²¹. Sin embargo, el VEM y el HTLV-1 transforman células T CD4+ lo que puede significar que utilicen mecanismos similares²³.

1.3.3. Transmisión

El contacto directo e indirecto entre aves afecta la difusión del virus. Se realiza principalmente por vía aérea²⁴. Las células epiteliales en la capa queratinizada del folículo plumoso sirven como fuente de contaminación²⁵. Aparentemente no hay transmisión vertical²⁶ y se descarta la transmisión de la madre a su descendencia por contaminación externa del huevo debido a que el VEM no sobrevive a las temperaturas y humedades empleadas en la incubación²⁷.

1.3.4. Periodo de incubación

Los pollitos inoculados al día de edad empiezan a excretar el VEM a partir de la segunda semana postinoculación (PI)²⁸, y la máxima excreción se produce entre la tercera y la quinta semana PI²⁹. La infección citolítica se presenta tres a seis días PI y son seguidas por las lesiones degenerativas en los órganos linfoides entre seis a ocho días PI. La infiltración monocítica se puede encontrar en nervios u otros órganos después de dos semanas³⁰. Los signos clínicos y las lesiones macroscópicas no aparecen sino hasta la tercera o cuarta semana³¹.

Es difícil de determinar el periodo de incubación bajo condiciones de campo. Mientras que unos brotes ocurren entre las tres a cuatro semanas de edad, los casos más severos comienzan después de la octava semana³². En aves ponedoras los signos clínicos se observan a partir de la semana 16-18 e incluso pueden ocurrir a partir de la semana 24-30³³.

1.3.5. Tipos de infección

Infección productiva

Se produce la replicación del ADN viral, se sintetizan los antígenos y en algunos casos se producen partículas virales³². Hay dos formas de infección productiva, la completamente productiva, en la cual el VEM se encuentra en el epitelio del folículo plumoso y resulta en el desarrollo de un gran número de viriones envueltos e infectantes; y la productiva restrictiva durante la cual se producen viriones no envueltos y por lo tanto no infectantes²⁵. La infección productiva, en todo tipo de células, es lítica y conduce a la formación de cuerpos de inclusión intranucleares³².

Infección latente

Esta infección no es productiva. Aunque se pueden transcribir unos genes, no ocurre la translación y por lo tanto no se encuentran virus o antígenos asociados a tumores³⁴.

Infección transformante

Ocurre por definición en las células transformadas por el serotipo 1 del VEM. Se caracteriza por una elevada expresión del genoma del VEM, lo que ocasionalmente resulta en la producción de antígeno³². En las células transformadas solamente se ha detectado el antígeno pp38³⁵, pero su frecuencia es variable.

El antígeno tumoral asociado a la superficie (MATSA, por sus siglas en inglés de *Marek's Disease tumor – associated surface antigen*) se ha detectado en células de linfomas inducidos por el VEM³⁶. Aunque inicialmente no se asoció con los linfocitos en infección latente³⁷ se ha detectado MATSA en linfocitos de aves vacunadas con cepas no oncogénicas del VEM^{38,39} y en

posteriores estudios con anticuerpos monoclonales han revelado la presencia del MATSA en células T activadas de aves no infectadas⁴⁰. Por lo tanto ahora el MATSA no se considera específico del tumor sino como un antígeno del hospedador³².

1.3.6. Patogenia

Se observan cuatro fases de la infección bien delimitadas: 1) infección viral productiva - restrictiva temprana que provoca principalmente cambios degenerativos, 2) infección latente, 3) una segunda fase citolítica, con infección productiva – restrictiva que coincide con inmunosupresión permanente y 4) una fase proliferativa que involucra células linfoides infectadas pero no productivas que pueden o no progresar a la formación del linfoma³².

La vía de entrada del virus es el tracto respiratorio, donde probablemente es fagocitado. Poco después se puede detectar la infección citolítica en el bazo, bolsa de Fabricio y timo. Shek *et al.*, descubrieron que las principales células blanco en estos órganos eran los linfocitos B, aunque también unas células T activadas son infectadas y también sufren degeneración⁴¹. La necrosis ocasionada durante esta etapa provoca una inflamación aguda con infiltración de macrófagos, granulocitos y linfocitos⁴². Puede presentarse atrofia de la bolsa de Fabricio y el timo.

Después de 6 a 7 días se inicia la fase latente que coincide con el desarrollo de la respuesta inmune y al parecer la inmunidad celular juega un papel importante en el cambio de fase. La mayoría de las células infectadas latentes son linfocitos T activados, aunque también puede haber unos linfocitos B involucrados^{41,43}. Las aves resistentes por lo general no progresan a la fase latente y persisten en una infección productiva de bajo grado en el epitelio del folículo plumoso⁴⁴.

Las aves susceptibles desarrollan una segunda infección citolítica, después de la segunda o tercera semana, que coincide con la inmunosupresión permanente. Los órganos linfoides se ven involucrados y se pueden encontrar focos localizados de la infección en los tejidos de origen epitelial en varios órganos viscerales, como riñones, páncreas, glándula adrenal, proventrículo y especialmente en la piel. Hay necrosis focal y reacción inflamatoria alrededor de las áreas afectadas³².

Los cambios linfoproliferativos constituyen la última etapa de la enfermedad y puede conducir al desarrollo de tumores aunque la regresión de las lesiones puede ocurrir antes o después de la aparición de los linfomas. La muerte puede ocurrir en cualquier momento a partir de la tercera semana de iniciado el proceso⁴⁵.

La composición de los linfomas es compleja y se forma de una mezcla células neoplásicas, inflamatorias e inmunológicamente activas⁴⁶. La célula blanco de la transformación son los linfocitos T activados, CD4⁺, MHC clase I, MHC clase II, IL-2R, CD28^{lo/-}, pp38⁻, gB⁻, TCR⁺ y AV37^{hi}⁴⁷.

1.3.7. Signos clínicos

Generalmente se observa una parálisis asimétrica progresiva que llega a ser completa en una o más extremidades. Los signos varían de acuerdo a los nervios afectados. Así, si los nervios que controlan el cuello se encuentran comprometidos, la cabeza se sostendrá abajo y puede presentarse tortícolis. Una postura característica se observa cuando hay una parálisis unilateral de la pierna en la cual una extremidad se encuentra totalmente extendida hacia delante, mientras que la otra hacia atrás³².

El síndrome de parálisis transitoria se caracteriza por diversos grados de ataxia y parálisis corporal parcial o total después de 8-12 días PI y dura 1 a 2 días. Algunas de las aves se pueden recuperar pero mueren unas pocas

semanas de EM clínica. Este síndrome aparece como resultado a edema cerebral vasogénico³².

Se puede producir ceguera como resultado del compromiso del iris, perdiéndose gradualmente la habilidad para regular la intensidad de la luz³².

Signos inespecíficos como diarrea, pérdida de peso y anorexia pueden ser observados especialmente en aves afectadas por un tiempo prolongado. La muerte se puede presentar por inanición y deshidratación debido a la dificultad para acercarse al alimento y al agua³².

1.3.8. Hallazgos macroscópicos

Aunque al aumento del tamaño de los nervios periféricos y los linfomas viscerales son comunes en la EM no son patognomónicos. Por lo tanto otros criterios como la edad y la distribución de las lesiones deben ser considerados en el diagnóstico de la EM. Se puede diagnosticar histológicamente la EM basándose en los hallazgos macroscópicos si al menos una de las siguientes condiciones se cumple: 1) aumento leucocitario de los nervios periféricos; 2) tumores linfoides en varios tejidos en aves menores de 16 semanas; 3) tumores linfoides en vísceras en aves de 16 o más semanas de edad que no involucren la bolsa de Fabricio y 4) decoloración del iris e Irregularidad de la pupila³².

1.3.9. Histología

En los tumores de la EM se encuentra una población mixta de linfocitos pequeños y grandes, linfoblastos, células plasmáticas y células de Marek. Se pueden realizar impresiones de las lesiones de animales recién sacrificados para realizar una tinción con verde metil de pirorina o tinción de Shorr. Las células de lo linfomas de la EM infrecuentemente son positivas a esta técnica⁴⁶.

Los modelos animales son esenciales para entender los mecanismos moleculares de la carcinogénesis y los posibles compuestos que pueden ser usados como antineoplásicos. Las células neoplásicas de la EM, al igual que las células de los linfomas de la enfermedad de Hodgkin (EH) y en algunas ocasiones del linfoma no Hodgkin (LNH) presentan una sobre expresión del antígeno CD30, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR II). Esto sugiere que existen vías comunes en la génesis de los linfomas. La expresión de CD30 en células neoplásicas promueve la supervivencia y la proliferación⁴⁹. Las células T transformadas por el VEM sobre expresan el antígeno MATSA, reconocido por el anticuerpo AV37⁴⁷, que no es más que el CD30 aviar lo que convierte a la EM en un modelo natural para linfomas CD30^{hi}⁴⁹.

1.4. Cáncer en humanos

Debido a la gran variedad de tipos celulares, cerca de 200 en los humanos, así como de oncogenes y genes supresores se pueden presentar por lo menos 600 diferentes tipos de tumores y cada uno tiene su historia natural.

1.4.1. Situación epidemiológica del Cáncer en México

México ha observado aumento de enfermedades crónico degenerativas, hasta constituirse en las principales causas de muerte y enfermedad⁵¹. El cáncer ocupa desde 1990 el segundo lugar como causa de muerte en el país. En orden descendente las neoplasias que causaron un mayor número de muertes se ubicaron en: tráquea, bronquios y pulmón (11.3%), estómago (8.8%), cuello uterino (7.9%), hígado y vías biliares (7.6%), próstata (7.2%), mama (6.6%) y leucemia (5.7%)⁵¹. En cuanto a los casos diagnosticados, los tumores más notificados fueron cuello uterino (24%), piel (14%), mama (11%), próstata (6%) y estómago (3%)⁵¹.

1.4.2. Mortalidad por Cáncer

En el año 2000 murieron 55,009 personas por cáncer, lo que correspondió al 13% de las defunciones. El 48% fueron hombres mientras que el 52% fueron mujeres. Las personas mayores de 45 años representan el grupo de mayor riesgo. Los tumores que causaron el mayor porcentaje de muertes fueron el de bronquios y pulmón (11%), estómago, (9%), cuello uterino (8%), hígado y vías biliares (8%) y próstata (7%). En los hombres el principal causante de muertes es el cáncer de bronquios y pulmón seguido por el de próstata, mientras que en las mujeres son el cáncer cérvico-uterino y mama⁵¹.

1.4.3. Linfoma en humanos

El linfoma es la proliferación neoplásica de linfocitos que aparecen como masas tisulares aisladas. Dentro del amplio grupo de los linfomas hay que separar la EH de los LNH. Las manifestaciones clínicas de las distintas neoplasias linfoides dependen de la distribución anatómica de la enfermedad. Dos tercios de los LNH y prácticamente todos los casos de EH se manifiestan por aumento indoloro de los ganglios linfáticos que puede ser localizado o generalizado. Para clasificar a los LNH en 1982 se creó la *Working Formulation for Clinical Usage*, sin embargo, debido a las deficiencias que presentaba se decidió en 1994 reemplazarla por la *Revised European – American Classification of Lymphoid Neoplasm* (REAL), donde se describen las neoplasias que presuntamente constituyen entidades anatomoclínicas características, basándose en las manifestaciones clínicas, la morfología, el inmunotipo y el genotipo. Según el inmunotipo se clasifican en cuatro grandes grupos: 1) neoplasias de precursores de las células B, 2) neoplasias de células B periféricas, 3) neoplasias de precursores de células T y 4) neoplasias de células T periféricas y de células citolíticas naturales⁵².

1.4.3.1. Enfermedad de Hodgkin

Abarca un grupo de afecciones que se diferencian de los LNH en varios aspectos. A diferencia de los LNH que surgen con frecuencia en sitios extraganglionares y se extienden de forma imprevisible, la EH surge en un ganglio o cadena de ganglios y se propaga por contigüidad. Morfológicamente se caracteriza por células neoplásicas gigantes, denominadas de Reed – Sternberg (RS), que inducen la acumulación reactiva de linfocitos, histiocitos y granulocitos. La EH representa el 0.7% de todos los casos nuevos de cáncer que aparecen en EUA. Su importancia radica en que es una de las neoplasias malignas más frecuentes en adultos jóvenes, pues se diagnostica en promedio a los 32 años de edad. Existen tres formas principales de EH: Esclerosis nodular, de celularidad mixta y de predominio linfocítico. En esta última el origen de las células de RS son linfocitos B, mientras que en las otras su origen continúa siendo un enigma. Las células RS expresan en su superficie moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II y B7, característicos de las células presentadoras de antígenos, como los macrófagos y los linfocitos B. Durante muchos años se ha sospechado que el Virus Epstein Barr (VEB) es el agente etiológico de la EH. Los pacientes con antecedentes de mononucleosis infecciosa o con títulos de anticuerpos elevados contra los antígenos del VEB tienen un riesgo mayor de EH. En las células de RS se pueden reconocer los genomas del VEB y las transcripciones del RNA específicas del VEB, en un 40% de los casos de esclerosis nodular y en un 60 a 70% de las formas de celularidad mixta de EH. Por lo tanto la infección con el VEB probablemente sea uno de los fenómenos que intervienen en la patogenia de la EH, pero no se descarta la participación de otros agentes infecciosos desconocidos en la EH, especialmente en los casos negativos al VEB⁵².

En 1964, el protocolo MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, procarbina y prednisona) fue usado por primera vez con éxito en el tratamiento de pacientes con enfermedad avanzada⁵³. Posteriormente se

desarrolló en Italia el protocolo ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine y dacarbazine) que mostró mayor actividad⁵⁴. La inmunoterapia es una de las terapias más promisorias en el tratamiento del linfoma. El anticuerpo monoclonal anti CD20 rituximab ha mostrado ser útil para el tratamiento de diferentes tipos de linfomas de células B⁵⁵.

En México durante el año 2000 se notificaron 922 casos de la EH que corresponden a un caso por cada 100000 habitantes. El 58% se presentaron en hombres y el 42% en mujeres. La población en la que se ha presentado el mayor número de casos es la posproductiva que comprende a las personas de 65 años o más. La edad infantil y preescolar tienen el menor número de casos registrados⁵¹.

1.4.3.2. Linfomas no Hodgkin

Linfoma de células T periféricas, no especificado

Debido a que los linfomas de células T periféricas son heterogéneos y nada fácil de clasificar se ha creado este grupo diagnóstico⁵².

Estos tumores invaden y desplazan difusamente la arquitectura de los ganglios linfáticos afectados y suelen estar formados por una mezcla de células T malignas de tamaño pequeño, mediano y grande. El diagnóstico sólo puede confirmarse por inmunofenotipificación. Presentan un fenotipo de células T maduras que suelen expresar CD2, CD5, CD3 y receptores alfa-beta y gamma-delta de las células T⁵².

Leucemia / Linfoma de células T del adulto

Es una neoplasia de células T CD4+ que se observan en pacientes infectados por el Virus linfotrópico de las células T de humano (HTLV-1). Se caracteriza por lesiones cutáneas, adenopatías generalizadas,

hepatoesplenomegalia, linfocitosis en sangre periférica e hipercalcemia. El aspecto de las células tumorales varía mucho pero en los tejidos afectados y en la sangre periférica suelen encontrarse células con núcleos multilobulados y con menor frecuencia células gigantes multinucleadas parecidas a las de RS. Es una patología de proceso rápido, mortal en cuestión de meses a un año a pesar de una quimioterapia energética. El HTLV-1 además de producir neoplasias linfoides, también puede causar un proceso desmielinizante progresivo que afecta al sistema nervioso central⁵².

Durante el año 2000 se notificaron 3,373 casos de linfomas no Hodgkin que corresponden a tres casos registrados por cada 100,000 habitantes. El 53% se presentaron en hombres y el 47% en mujeres. Por grupos de edad se observa un aumento progresivo de casos registrados. El mayor número de casos se presentó en personas mayores a 65 años de edad⁵¹.

No hay consenso en el terapia óptima para la Leucemia / Linfoma de células T del adulto. La media de supervivencia es baja con 6.2 meses en el caso de leucemia aguda y 10.2 meses para el linfoma⁵⁶. Los protocolos similares a CHOP (Ciclofosfamida, Adriamycina, Vincristina y Prednisona) han tenido tasas de respuesta completa de 17-22%⁵⁶. Protocolos nuevos o más intensos pueden asociarse con una mayor respuesta completa pero no con un mejor pronóstico⁵⁷. Estudios usando interferón α y zidovudine (AZT) han mostrado respuestas significativas (66%) en pacientes, incluso en aquellos que no ha respondido a la quimioterapia⁵⁸. Anticuerpos monoclonales, conjugados o no, dirigidos contra el receptor de interleucina 2 han mostrado actividad, pero aun esta en estudio la forma de integrarlos a la terapia⁵⁹.

1.5. Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de suicidio celular altamente regulado que es importante en procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la respuesta a la quimioterapia en cáncer, y la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas⁶⁰. Requiere la activación de Proteasas de cisteína llamadas caspasas, que son capaces de romper proteínas estructurales y funcionales como las del citoesqueleto y proteínas del sistema de reparación del DNA⁶¹.

Las células apoptóticas fueron descritas por primera vez por Kerr *et al.*, en 1972, diferenciándolas de las células necróticas basándose en criterios morfológicos como la condensación de la cromatina en la periferia del núcleo y la formación de cuerpos apoptóticos⁶². La primera evidencia bioquímica de la apoptosis fue publicada por Skalka *et al.*, en 1976, tras observar la degradación del DNA de linfocitos irradiados *in vivo*, en fragmentos de tamaño oligonucleosomal⁶³. Este evento posteriormente fue asociado a la actividad de endonucleasas y desde entonces ha sido usado rutinariamente como un marcador bioquímico de apoptosis⁶⁴.

Las caspasas son expresadas como precursores y deben ser activadas en el citosol mediante ruptura proteolítica, casi siempre por otra caspasa, formando así una cascada de activación. Las moléculas se fragmentan en subunidades de 10 a 20kDa las cuales se heterodimizan y se asocian en tetrámeros que constituyen la enzima activada^{65,66}. Basándose en análisis filogenéticos pueden ser divididas en tres subgrupos. CASP-1 incluye las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, CASP-3 a las caspasas 3, 6, 7, 8, 10 y CASP 2 a 2 y 9⁶⁷. De acuerdo a su función pueden clasificarse como iniciadoras y ejecutoras. Caspasa 3 es una de las más importantes ejecutoras que inicia la vía común final de destrucción celular. La caspasa 3 puede ser activada por las caspasas 8, 9 y 10. Las caspasas son responsables de la activación de la endonucleasa, desoxirribonucleasa activada por caspasas (CAD), ubicada en el citosol unida a

un inhibidor (ICAD) mediante la destrucción de esta unión⁶⁸. El primer sustrato de las caspasas en ser identificado fue la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP). Tanto PARP como DNA-PK son sustratos de la caspasa 3⁶⁹. Se sugirió entonces, que las caspasas dismantelaban el proceso de reparación del DNA pero posteriormente se observó que había suficiente evidencia para sugerir que la caspasa 3 es necesaria para que se produzcan otros eventos que se observan en la apoptosis, como la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina durante diversos procesos de estimulación de la muerte celular⁷⁰. Woo *et al.*, en 1998 demostraron la participación de la caspasa 3 en la ejecución de apoptosis en células linfoides periféricas, células madre, neutrófilos y fibroblastos. Aunque ellos concluyeron que el papel exacto de la caspasa 3 dependía del tejido, el tipo celular, el ciclo celular o el tipo de estímulo de muerte celular, las células que carecían de caspasa 3 no evidenciaban fragmentación del DNA ni condensación nuclear lo que sugiere un importante papel de la caspasa 3 en los eventos nucleares de la apoptosis⁷¹. Estudios realizados en cultivos celulares de MCF-7 (carcinoma mamario) que carecen de caspasa 3 debido a una mutación genética, muestran que éstas mueren sin mostrar fragmentación del DNA ni condensación de la cromatina⁷². Al transferir cDNA de caspasa 3 a esta línea celular se restablece la capacidad de producirse fragmentación del DNA y condensación de la cromatina⁷³. Aunque el papel de la caspasa 3 en la apoptosis es claro, los sustratos específicos que deben ser rotos para que se produzcan los cambios morfológicos y bioquímicos nucleares característicos de la muerte por apoptosis permanecen sin ser determinados. Aproximadamente 40 de los 70 o más sustratos identificados son susceptibles de la acción de la caspasa 3⁷⁴. Aunque muchas de estas proteínas parecen ser dispensables en el proceso apoptótico, hay varios sustratos de caspasa 3 y dos de la caspasa 6 que han recibido considerable atención. Los sustratos de caspasas que están involucrados en la regulación de la integridad del genoma son PAK2, DNA-PK, PARP y ICAD/DFP-45, mientras que gelsolín, acinus, NuMA y lamin son importantes en el mantenimiento del citoesqueleto y la estructura nuclear. Casciola-Rosen⁷⁵ *et al.*, demostraron la habilidad de la caspasa 3 de romper

DNA-PK de una forma similar a PARP. Estas dos enzimas son conocidas por su participación en la reparación del DNA. DNA-PK ha mostrado estar involucrada en la reparación de dobles cadenas de DNA rotas y PARP por su parte, cataliza las formación de poli(ADP-ribosa) y también esta involucrada en la reparación y la replicación del DNA⁷⁶. Un sustrato de caspasa 3 y 7 que ha recibido considerable atención recientemente es ICAD/DFF-45 debido a su habilidad de regular la fragmentación del DNA nuclear en respuesta a diferentes estímulos. Éste es el componente inhibitorio de CAD/DFF-40^{77,78} que bajo condiciones normales se encuentra unido a la forma inactiva de su inhibidor. En presencia de un estímulo apoptótico, la caspasa 3 rompe a ICAD/DFF-45 liberando a CAD/DFF-40 lo que resulta en la activación de nucleasas, condensación nuclear y fragmentación del DNA^{77,78,79,80,81}. Dos sustratos que han recibido atención por su habilidad de mantener la integridad estructural del núcleo y que son cortados por caspasa 6 son lamin y NuMA⁷⁰.

La función mitocondrial es importante para llevar a cabo la apoptosis, ya que se requiere ATP, pero también es importante en su regulación ya que en ella residen proteínas de la familia bcl-2. Los estímulos apoptóticos incrementan la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria permitiendo la salida de citocromo *c* al citosol donde se une a Apaf-1 y a la caspasa 9 formando el llamado apoptosoma que conduce a apoptosis⁶⁸.

La formación del poro de transición permite la salida de moléculas mitocondriales al citosol de hasta 1.5kDa. Su importancia radica en el hecho de que muchos sistemas de inhibición de la apertura del poro, como las ciclosporinas y las proteínas antiapoptóticas de la familia bcl-2 previenen apoptosis. Sustancias como Bax promueven apoptosis. Sin embargo, esta teoría presenta inconvenientes ya que algunas formas de apoptosis parecen ser independientes de la apertura del poro de transición y a que una de las principales características de la apoptosis *in vivo* es que la mitocondria permanece intacta⁶⁸.

1.5.1. Regulación de la apoptosis

La proteína p53 ha mostrado su importancia en la supresión de tumores, pero además facilita la reparación o eliminación de las células alteradas para proteger al organismo⁸². Una de sus principales funciones es la de inducir apoptosis. Aunque los mecanismos bioquímicos que involucran su actividad no están claros, se sabe que p53 participa en las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, a través de la despolarización mitocondrial o sensibilizando las células. p53 incrementa la expresión celular de receptores de muerte celular y estimula la infraestructura mediante la expresión del factor 1 de actividad proteasa de la apoptosis, uno de los componentes esenciales del apoptosoma. p53 activa los genes asociados a la apoptosis como los denominados genes inducibles por p53, así como los que codifican para Bax, Fas/CD95, receptor de muerte 4 y 5 y Bid⁸³.

La activación de p53 puede modular directa o indirectamente la expresión de proteínas involucradas en el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y de ese modo controlar la liberación de proteínas mitocondriales durante la apoptosis. Recientemente, se demostró que una pequeña fracción de p53 permite la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, formando complejos con las proteínas protectoras bcl-XL y bcl-2, inhibiéndolas y permitiendo la liberación de citocromo *c*⁸⁴.

La familia bcl-2 son un grupo de genes reguladores que pueden inhibir o promover la apoptosis. Los inhibidores de apoptosis son bcl-2, bcl-xL, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1 y A1 y los promotores son bax, bak, bcl-xS, bad, bid, bik y Hrk (1-1a5). Las proteínas codificadas por estos genes poseen cuatro dominios conservados: BH1, BH2, BH3, BH4 los cuales, sin embargo, no se encuentran en todos ellos. Dentro de los dominios pueden haber homo y heterodímeros y de esa forma influir sobre la apoptosis. La dimerización entre las proteínas bax, proapoptótica y bcl-2, antiapoptótica es importante en la regulación de la apoptosis^{85,86,87}. Cuando hay un exceso de bax, se forman homodímeros

bax/bax que promueven la apoptosis^{79,80}. Un exceso de bcl-2 favorece la formación de heterodímeros bcl-2/bax que inhiben la apoptosis^{87,88}. La combinación bcl-xL/bax conduce a una inhibición de la apoptosis⁸⁵, mientras que bad/bcl-2 y bcl-xL dan como resultado un exceso de bax y la consecuente formación de homodímeros bax/bax promotores de la apoptosis⁸⁶.

1.6. Casiopeínas

Las Casiopeínas[®] son un grupo de compuestos de coordinación de cobre desarrollados por el grupo de trabajo encabezado por la Doctora Lena Ruiz en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a finales de la década del 70. Con el objeto de diseñar y sintetizar un antineoplásico menos tóxico se consideró que el cobre podría brindar esta característica debido a que es un metal esencial. Su estructura general presenta en la esfera de coordinación un ligante bidentado de tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O)^{89,90}.

Se ha comprobado la actividad antineoplásica de algunos compuestos de esta familia mediante ensayos *in vitro*^{91,92} en *in vivo*⁹³, así como su capacidad para inducir apoptosis por vías dependientes e independientes de caspasas⁹⁴.

2. Justificación

Actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte en los Estados Unidos Mexicanos, después de las enfermedades cardiovasculares⁵¹. Una de las opciones para su tratamiento es la quimioterapia con moléculas de origen orgánico e inorgánico, pero debido a la elevada toxicidad de estos compuestos y a la resistencia que presentan algunos tumores es necesario continuar la búsqueda de nuevas moléculas que permitan superar estos inconvenientes. Por otra parte, es importante considerar que el país aún no cuenta con antineoplásicos propios, por lo que se ve obligado a importarlos a costos elevados limitando el acceso a ellos a una pequeña fracción de la población. Debido a la similitud que presentan las enfermedades de Marek y la Leucemia / Linfoma de células T del adulto en cuanto al tipo de agente etiológico y a la célula blanco que éstos transforman es posible considerar a la Enfermedad de Marek como un modelo para la investigación de nuevos compuestos encaminados a ser incluidos dentro de los protocolos para el tratamiento del cáncer. El estudio inmunohistoquímico de las vías apoptóticas dependientes de caspasas, así como la fragmentación del ADN por medio de TUNEL en los linfomas de las aves reproductoras con la enfermedad de Marek, ayudará a comprender mejor los mecanismos de activación apoptótica de la Casiopeína[®] III-ia *in vivo*.

3. Hipótesis

Los linfomas de las aves reproductoras con la enfermedad de Marek tratadas con Casiopeína[®] III-ia, presentarán una mayor activación de caspasa 3 así como una mayor detección de fragmentos de DNA 3'OH que los linfomas de las aves no tratadas.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la Casiopeína[®] III-ia para inducir apoptosis, mediante la determinación inmunohistoquímica de la activación de caspasa 3 y TUNEL, en linfomas de aves reproductoras con la enfermedad de Marek, bajo condiciones de campo.

4.2. Objetivos específicos

Determinar histopatológicamente los órganos que presenten neoplasias en las aves reproductoras con la enfermedad de Marek.

Evaluar por medio de inmunohistoquímica, la actividad de la caspasa 3 en linfomas de aves con la enfermedad de Marek tratados con Casiopeína[®] III-ia.

Determinar el índice apoptótico mediante la prueba de TUNEL en las neoplasias de aves con la enfermedad de Marek tratadas con Casiopeína[®] III-ia.

5. Materiales y métodos.

5.1. Animales

Se seleccionaron 40 gallinas de 36 semanas de edad de la estirpe Cobb de una granja ubicada en el estado de Jalisco en la que recientemente se diagnosticó por medio de histopatología la EM. Se dividieron en dos grupos, experimental (20) y testigo (20),

5.2. Tratamiento

Los animales experimentales recibieron una dosis de 0.25 mg/kg de Casiopeína[®] III-ia diluida en agua inyectable por vía endovenosa los días uno, cinco y nueve. La dosis se determinó teniendo en cuenta que la dosis letal 50 en gallinas es 0.95mg/kg (Ver Anexo A). El protocolo de tratamiento fue adoptado por los resultados que ha mostrado en experimentos anteriores. La Casiopeína[®] III-ia [(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetylacetonato) cobre(II)] nitrato fue suministrada por la Dra. Lena Ruiz Ramírez, Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

5.3. Muestras

El día 13 todas las aves fueron sacrificadas por dislocación de la articulación atlantoxipital y se les realizó necropsia siguiendo el procedimiento descrito por Casaubón⁹⁵. Se tomaron muestras de hígado, proventrículo, bazo, riñón, corazón, pulmón, nervio, encéfalo, ovario, mesenterio e intestino. El tamaño de las muestras fue de 1 x 1 x 0.5 cm y se fijaron por 24 horas a temperatura ambiente en formalina al 10%. En el departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se incluyeron las muestras en parafina y se cortaron secciones de 5 µm para ser teñidas con hematoxilina y eosina (HE)⁹⁶ (Ver Anexo B).

5.4. Índice mitótico

En las secciones teñidas con HE, de los órganos que presentaron linfoma se realizó un conteo de 100 células neoplásicas en 10 campos de 40x aleatorios, para determinar el índice apoptótico.

5.5. Inmunohistoquímica

Los tejidos de los animales tratados y testigos que presentaron linfomas fueron evaluados por medio de inmunohistoquímica con la finalidad de medir la activación de la caspasa 3. Se cortaron secciones de 2 μm y se siguieron las instrucciones dadas por DAKO en su manual DAKO LSAB[®]+Kit, Peroxidase, K0690 (Ver Anexo C). Este paquete utiliza una técnica refinada de avidina-biotina en la cual un anticuerpo secundario biotinilado reacciona con un conjugado de peroxidasa-estreptoavidina para reconocer anticuerpos primarios de conejo, ratón o cabra. El procedimiento fue realizado en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología de México.

Se usaron anticuerpos policlonales caprinos contra caspasa 3 activada p20 (L-18): sc- 1225 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) a una dilución de 1:50.

El inmunorreconocimiento se observó por la coloración marrón en el citoplasma. Se contaron 100 células neoplásicas en 10 campos de 40x seleccionados aleatoriamente de cada linfoma para determinar el índice de células con caspasa 3 activada.

5.6. Índice apoptótico

El índice apoptótico se estimó por TUNEL mediante el *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* catálogo No. 11684817001 (ROCHE), que detecta fragmentos del DNA 3'OH mediante la Transferasa deoxynucleotidyl Terminal (TdT) con fluoresceína-dUTP. Se seguirán las instrucciones dadas por el productor en su manual *Roche Molecular Biochemicals, Apoptosis and Cell Proliferario Pag:33-34* (Ver Anexo D)

Se realizó un conteo de 100 células en 10 campos aleatorios de 40x de cada linfoma para determinar la presencia de células en apoptosis o cuerpos apoptóticos, reconocibles al adquirir la intensa coloración marrón.

5.7. Análisis estadístico

Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se compararon el índice mitótico, el índice de activación de caspasa 3 y el índice apoptótico en los linfomas de las aves reproductoras pesadas de la estirpe Cobb, testigo y tratados, mediante la prueba de *t* de Student. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como indicativo de una relación significativamente estadística.

6. Resultados

6.1. Necropsia

Durante el examen macroscópico de los órganos de las aves, se encontraron en el parénquima hepático múltiples puntos blancos de aproximadamente 1-3mm de diámetro distribuidos en forma aleatoria en 7 hígados del grupo tratado y 5 del grupo testigo. En cuanto al bazo se encontraron puntos blancos multifocales de 1-3mm en 4 bazos del grupo tratado y 6 del grupo testigo. En el caso del riñón se observaron áreas blancas irregulares multifocales de 0.1-0.5mm de diámetro en 4 animales del grupo tratado y en 5 del grupo testigo. En 4 corazones de las aves del grupo tratado y 5 del grupo testigo se observaron nódulos blanquecinos, firmes y suaves al corte, de 5-10mm de diámetro en el miocardio, principalmente en el área ventricular. En dos animales del grupo tratado se observó material blanquecino abundante, extendido a lo largo y ancho del mesenterio intestinal.

Los proventrículos, pulmones, plexos celiacos, nervios periféricos, encéfalos e intestinos de los animales del grupo tratado y testigo se observaron sin cambios patológicos aparentes al examen macroscópico.

6.2. Histopatología

Mediante la tinción de HE se determinó que 15 animales del grupo tratado y 14 del grupo testigo presentaron lesiones microscópicas que concuerdan con las lesiones observadas en los animales con la EM.

6.2.1. Descripción microscópica

Hígado

Principalmente alrededor de venas centrales y espacios porta se observan densos agregados de células linfoides neoplásicas pleomórficas con un alto grado de anisocitosis y anisonucleosis, sostenidas por un fino estroma de tejido fibrovascular que infiltran el parénquima hepático y sustituyen a los cordones hepáticos. En algunas ocasiones se observan numerosos grupos de células linfoides intravasculares. El índice mitótico (IM) observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.1 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue 4.7, mientras que en el grupo tratado fue 4.86. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 6.2.1.10 (Ver Anexo E).

Proventrículo

En la mucosa y entre la túnica muscular y la serosa se observó un intenso infiltrado linfoide neoplásico conformado por células pleomórficas sostenidas por un fino estroma de tejido fibrovascular, con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.2 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue 5.4, mientras que en el grupo tratado fue 5.2 y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 6.2.1.10 (Ver Anexo E).

Bazo

En el parénquima esplénico se observó denso infiltrado linfoide neoplásico conformado por células pleomórficas sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular, con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis que sustituye a los linfocitos de las pulpas blanca y roja. El índice mitótico

observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.3 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue 5.8, mientras que en el grupo tratado fue 6.13. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 7.2.1.10 (Ver Anexo E).

Riñón

En el parénquima cortical se observó denso agregado linfoide neoplásico conformado por células pleomórficas con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis, sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular, que infiltran el espacio entre los túbulos contorneados distales y proximales y sustituyen a los corpúsculos renales. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.4 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue 5.3, mientras que en el grupo tratado fue de 4.5. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 6.2.1.10 (Ver Anexo E).

Corazón

Se observó intenso infiltrado linfoide neoplásico en el miocardio conformado por células pleomórficas con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis, sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.5 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue de 4.67, mientras que en el grupo tratado fue de 4.28. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 6.2.1.10 (Ver Anexo E).

Pulmón

Se observó intenso infiltrado linfoide neoplásico en el parénquima pulmonar conformado por células pleomórficas con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis, sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.6 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue 4, mientras que en el grupo tratado fue de 3.75. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 6.2.1.10 (Ver Anexo E).

Nervio periférico

En las secciones del nervio ciático se observó edema separando las fibras nerviosas y un infiltrado linfoide moderado con linfoblastos y linfocitos pequeños. No se observaron figuras mitóticas en las secciones con linfoma de este órgano.

Encéfalo

En el cerebro se observó intensa vasculitis con hipertrofia e hiperplasia de las células endoteliales acompañado de un infiltrado de heterófilos en las paredes de los vasos sanguíneos. Por otra parte se presentó edema perivascular al igual que un denso infiltrado linfoide perivascular. No se observaron figuras mitóticas en las secciones con linfoma de este órgano.

Ovario

En la médula y la corteza ovárica se observó intenso infiltrado linfoide neoplásico conformado por células pleomórficas sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular, con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano

se muestra en el Cuadro 6.2.1.7 (Ver Anexo E). En el grupo testigo la media del IM fue de 5.15, mientras que en el grupo tratado fue 5. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$) y se ilustran en el cuadro 6.2.1.10 (Ver Anexo E).

Mesenterio

Se observó intenso infiltrado linfoide neoplásico conformado por células pleomórficas con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis, sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.8 (Ver Anexo E). En el grupo testigo no se presentaron neoplasias en el mesenterio por lo que no se determinó su IM, mientras que en el grupo tratado fue de 2.6%

Intestino

Se observó denso infiltrado de células linfoides neoplásicas pleomórficas con un alto grado de anisocitosis y anisocariosis en la mucosa intestinal, sostenidas por fino estroma de tejido fibrovascular y sustituyen a la lámina propia de las vellosidades intestinales. El índice mitótico observado en cada una de las secciones con linfoma en este órgano se muestra en el Cuadro 6.2.1.9 (Ver Anexo E). En el grupo testigo el promedio del IM fue de 3.7% mientras que en el grupo tratado fue de 4.2%.

6.2.2. Diagnóstico morfológico

El linfoma pleomórfico multicéntrico (hígado, proventrículo, bazo, riñón, corazón, pulmón, nervio, encéfalo, ovario, mesenterio e intestino) y el infiltrado linfoide moderado en nervio periférico de las aves de los grupos tratado y testigo, son coherentes con los hallazgos microscópicos de la EM.

6.3. Inmunohistoquímica

El índice de activación de la caspasa 3 en las células neoplásicas en las secciones de hígado, proventrículo, bazo, riñón, corazón, pulmón y ovario se ilustran en los cuadros 6.3.1 a 6.3.7 (Ver Anexo E). No se incluyeron para este análisis las secciones de mesenterio, e intestino debido al bajo n que presentaron, lo que impedía su comparación. El índice de activación de la caspasa 3 en el grupo testigo fue: en hígado 3.25%, proventrículo 3.4%, bazo 2.9%, riñón 3.7%, corazón 3.3%, pulmón 3.2%, ovario 4%. En el grupo tratado fue: hígado 3.5%, proventrículo 3.3%, bazo 3.2%, riñón 3.7%, corazón 3%, pulmón 3%, ovario 3.6%. Al comparar las medias de los índices de activación de caspasa 3 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$). (Ver cuadro 6.3.8, Anexo E).

6.4. TUNEL

Se determinó el porcentaje de fragmentos de DNA 3'OH en las secciones hígado y corazón y se ilustra en los cuadros 6.4.1 y 6.4.2 (Ver Anexo E). El índice de fragmentos de DNA 3'OH en el grupo testigo fue: hígado 0.24%, corazón 0.21%. En el grupo tratado fue de: hígado 0.24% y corazón 0.23%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($P>0.05$). (Ver cuadro 6.4.3 Anexo E).

7. Discusión

Las lesiones macroscópicas observadas en el presente estudio concuerdan con las descritas por Calnek³² en la EM, quien menciona que los tumores viscerales pueden ocurrir en ausencia de lesiones macroscópicas en los nervios. Los linfomas de la EM en la mayoría de las vísceras producen aumento del tamaño del órgano y por lo general una decoloración blanca o grisácea. Los linfomas pueden ser nódulos de tamaño variable, de color blanco o gris, de consistencia firme y suave al corte. El infiltrado linfoide del hígado puede causar la pérdida de la arquitectura lobular. También se pueden encontrar tumores nodulares en el hígado. El corazón afectado puede mostrarse pálido debido al infiltrado difuso o con uno o múltiples nódulos tumorales en el miocardio. Cuando el proventrículo y el pulmón están afectados se puede percibir un incremento en la firmeza del órgano a la palpación³².

La distribución usual de las lesiones que se presentan los animales con la EM ha sido descrita por Burmester y Witter⁹⁷, Satenes⁹⁸ e Ianconescu *et al.*⁹⁹. Pope¹⁰⁰ (1986) adaptó la información y encontró que el hígado, proventrículo, bazo, gónadas, nervio y cerebro son los órganos en que más comúnmente se presentan las neoplasias en la EM aguda seguidos por el páncreas, intestino, mesenterio, riñón, corazón, músculo, piel y en menor medida la bolsa de Fabricio, timo y ojo. Esta información concuerda con lo observado durante el presente estudio en donde el hígado, proventrículo y nervio fueron los órganos más afectados seguidos por el bazo, riñón, corazón, pulmón, encéfalo, mesenterio e intestino. No se presentaron alteraciones en el ojo y por la edad de las aves no fue posible hacer observaciones en la bolsa de Fabricio y el timo.

Las lesiones microscópicas observadas en el nervio periférico de las aves en el presente estudio concuerdan con la descripción hecha por Payne y Biggs³¹ y que denominaron lesión tipo B que es principalmente inflamatoria, caracterizada por un infiltrado ligero a moderado de células linfoides pequeñas

y células plasmáticas, usualmente acompañado de edema y en algunos casos con desmielinización y proliferación de las células de Schwann.

Las lesiones en el único cerebro que presentó cambios patológicos microscópicos concuerdan con las observadas y descritas por Gimeno *et al.*,¹⁰¹ tras la inoculación de aves de dos diferentes líneas genéticas con cepas muy virulentas y muy virulentas+ del serotipo 1 del VEM.

Se ha comprobado que los agentes antineoplásicos operan bajo diversos mecanismos de acción. Se ha descrito su capacidad para inducir la formación de radicales libres (agentes alquilantes y antraciclinas), interferir con la síntesis de ADN y RNA (antimetabolitos), alteración de microtúbulos (inhibidores de microtúbulos), inhibición de la función cromática (inhibidores de la topoisomerasa)¹⁰². Las Casiopeínas® han mostrado su capacidad de inducir la muerte celular por apoptosis mediante vías dependientes e independientes de caspasas, así como también mediante necrosis e inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)⁹⁴. Existe evidencia que sugiere que al estrés oxidativo como un mediador alternativo de la apoptosis¹⁰³. La adición de ERO o la disminución de antioxidantes endógenos pueden promover la muerte celular¹⁰⁴. Igualmente la Casiopeína® II induce la translocación de AIF mitocondrial y apoptosis, con y sin, activación de caspasa 3 *in vitro*⁹⁴. Sin embargo, su mecanismo de acción *in vivo*, aun no se ha descrito completamente y se está estudiando su posible inhibición de la mitosis celular. Al comparar los índices mitóticos encontrados durante el presente estudio en cada uno de los órganos de los grupos testigo y tratado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas y por lo tanto no hay evidencia de algún efecto de la Casiopeína® III-ia a la dosis de 0.25 mg/kg/c 4 días sobre ciclo celular de las células transformadas en el caso de la EM.

Los últimos años han sido testigos del impresionante esfuerzo internacional para establecer el papel de 20 nuevas moléculas en la apoptosis. Algunas de estas moléculas son receptores, otras parecen incrementar o

disminuir la probabilidad de que una célula desencadene sus mecanismos efectores de apoptosis. Todas son estudiadas como posibles blancos en la terapia antineoplásica¹⁰⁵. Las drogas antineoplásicas aun no se han diseñado para actuar sobre un específico blanco celular o molecular. La muerte celular inducida por los agentes antineoplásicos se ha considerado como una consecuencia de un bloqueo en la proliferación celular o simplemente toxicidad¹⁰⁶, pero estudios recientes han mostrado que la mayoría inducen apoptosis¹⁰⁷.

Algunos fármacos citotóxicos inducen la expresión de CD95L. CD95 hace parte de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Esto es importante considerando que las células T citotóxicas expresan CD95L y usan el sistema CD95 como uno de los más importantes mecanismos para matar células blanco¹⁰⁸. El cisplatino, doxorubicina, mitomicina, fluorouracil y camptotecin han mostrado su capacidad para sensibilizar líneas de carcinoma de colon y líneas leucémicas y se induce la apoptosis mediante CD95 por medio de anticuerpos agonistas a CD95L o células asesinas activadas^{109, 110}. Estos hallazgos pueden explicar porque la baja dosificación de quimioterapéuticos es efectiva en ciertos tratamientos¹⁰⁶.

La Casiopeína[®] III-ia, un nuevo agente antineoplásico, no indujo muerte celular por apoptosis en linfomas de aves de la estirpe Cobb con la EM bajo el régimen usado en este estudio. Los datos muestran bajos niveles de activación de caspasa 3 y diferencias no significativas entre los grupos testigo y tratado. Estos hallazgos difieren con lo encontrado por Trejo *et al.*,* que observaron la inducción de muerte celular por apoptosis con activación de caspasa 3 en cultivos celulares de glioma C6 de rata tratados con Casiopeína[®] III-ia. Parece claro que las Casiopeínas[®] inducen la muerte celular por apoptotitis o necrosis en células neoplásicas *in vitro*, pero su mecanismo de acción en modelos *in vivo* aun no esta totalmente esclarecido por lo que se sugiere se continúen realizando estudios encaminados a esclarecer esta incógnita.

* Comunicación personal, Cristina Trejo Solís, 2005.

La baja activación de caspasa 3 acompañado de un bajo nivel de fragmentos de ADN 3' determinado mediante la prueba de TUNEL sugieren que la muerte celular inducida por la Casiopeína® III-ia no se realiza mediante vías dependientes o independientes de caspasas al interior de la célula transformada en el caso de la EM. Posiblemente los resultados observados en el presente estudio puedan deberse a una baja dosificación, así como a un protocolo poco agresivo. Igualmente cabe la posibilidad de que los bajos niveles de apoptosis se puedan relacionar con el día de sacrificio de las aves o a que el linfoma inducido por el VEM es refractario a la acción de la Casiopeína® III-ia.

Finalmente, con el objeto de determinar si las Casiopeínas® tienen algún mecanismo de muerte celular *in vivo*, que incluya a la apoptosis se sugiere la realización de estudios encaminados a determinar la expresión de CD95L, la liberación de citocromo c, la translocación mitocondrial de AIF y la generación de ERO en modelos animales, así la determinación de supervivencia celular.

8. Bibliografía

1. Willis RA. The Spread of Tumors in Human Body. London, Butterworth and Co, 1952.
2. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patología estructural y funcion. Sexta ed. Philadelphia:Saunders, 1999.
3. Aly M. Fadly. Introducción Neoplásic diseases. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM editors. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press, 1997:369-413.
4. Marek J. Multiple Nevenentzuendung (Polyneuritis) bei Huennern. Dtsch Tierarztl Worchenschr 1907; 15:417-421.
5. Biggs PM. Marek's Disease – Current Status of Knowledge. Curr Top Microbiol Inmunol 1968;43:93-125.
6. Nacerian K, Solomon JJ, Witter RL, Burmester BR. Studies on the Etiology of Marek's disease. II. Finding of a Herpesvirus in cell culture. Proc Soc Exp Biol Med 1968;127:177-182.
7. Buckmaster AE, Scott SD, Sanderson MJ, Boursnell ME, Ross LJ and Binns MM. Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys – implications for herpesvirus classification . J Gen Virol 1988; 69:2033-2042.
8. Kawamura H, King DJ, Anderson DP. A Herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. Avian Dis 1969; 13:853-863.

9. Witter RL, Nazerian K, Purchase HG, Burgoyne GH. Isolation from turkeys of a cell – associate herpesvirus antigenically related to Marek’s disease virus. *Am J Vet Res* 1970;31:525-538.
10. Silva RF, Witter RL. Genomic expansion of Marek’s disease virus DNA is associated with serial in vivo passage. *J Virol* 1985;54:690-696.
11. Cui Z, Lee LF, Liu JL. Structural analysis and transcriptional mapping of the MDV genome encoding pp38, an antigen associated with transformed cells. *J Virol* 1991; 65:6509-6515.
12. Ono M, Kawaguchi Y, Maeda K, Kamiya N, Yohya Y, Kai C, Nicura M, Mikami T. Nucleotide sequence analysis of Marek’s disease virus (MDV) serotype 2 homolog of MDV serotype 1pp38, an antigen associated with transformed cells. *Virology* 1994;201:142-146.
13. Cho KO, Ohashi K, Onuma M. Electron microscopic and immunohistochemical localization of Marek’s Disease (MD) herpesvirus particles in MD skin lymphomas. *Vet Path* 1999;36:314-320.
14. Ross N, O’sullivan G, Rothwell C, Smith G, Burgess SC, Rennie M, Lee LF, Davison TF. Marek’s disease virus EcoRI-Q gene (meq) and a small RNA antisense to ICP4 are abundantly expressed in CD4+ cells and cells carrying a novel lymphoid marker, AV37, in Marek’s disease lymphomas. *J Gen Virol* 1997;78:2191-2198.
15. Xie Q, Anderson AS, Morgan RW, ICP4, pp38 and meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCC-MSB1 MDV-transformed lymphoblastoid cells. *J Virol* 1996;70:1125-1131.

16. DeLuca NA, Schaffer PA. Physical and functional domains of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein ICP4. *J Virol* 1985;62:732-743.
17. Prat WD, Cantello J, Morgan RW, Schat KA. Enhanced expression of Marek's disease virus – specific phosphoproteins after stable transfection of MSB-1 cells with the Marek's disease virus homologue of ICP4. *Virology* 1994; 201:132-136.
18. Sugaya K, Bradley G, Nonoyama M, Tanaka A. Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions. *J Virol* 1990;64:5773-5782.
19. Jones D, Lee L, Liu JL, Kung HJ, Tillotson JK. Marek's disease virus encodes a basic leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4042-4046.
20. Peng Q, Zeng M, Bhuiyan ZA, Ubukata E, Tanaka A, Nonoyama M, Shirazi Y. Isolation and characterization of Marek's disease virus (MDV) cDNAs mapping to the BamHI-I₂, BamHI-Q₂, and the BamHI-L fragments of the MDV genome from lymphoblastoid cells transformed and persistently infected with MDV. *Virology* 1995;213:590-599.
21. Venugopal K. Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control. *Res Vet Sci* 2000;69:17-23.
22. Liu JL, Ye Y, Lee LF, Kung HJ, Transforming potential of the herpesvirus oncoprotein MEQ: morphological transformation, serum independent growth, and inhibition of apoptosis. *J Virol* 1998;72:2338-395.

23. Quian Z, Brunovskis P, Rauscher F, Lee L, Kung HJ. The transactivation activity of Meq, a Marek's disease herpesvirus bZIP protein persistently expressed in latently-infected transformed Tcells. *J Virol* 1995;69:4037-4044.
24. Biggs PM, Spread of Marek's disease. In: Payne LN, editor. *Marek's Disease*. Boston:MA, 1985:329-340.
25. Calnek BW, Addinger HK, Kahn DE. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell freeherpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis* 1970;14:219-233.
26. Witter RL, Solomon JJ, Prospects for the control of Marek's disease through isolation rearing. *Prog immunobiol Stand* 1972;5:163-168.
27. Calnek BW, Hitchner SB. Survival and disinfection of Marek's disease virus and the effectiveness of filters in preventing airborne dissemination. *Poult Sci* 1973;52:35-43.
28. Kenzy SG, Biggs PM. Excretion of the Marek's disease agent by infected chickens. *Vet Rec* 1967;80:565-568.
29. Witter RL. Epidemiology of Marek's disease – A review. In: Biggs PM, de Thé G, Payne LN, editors. *Oncogenesis and herpesviruses*. Lyon:IARC. 1972:111-122.
30. Payne LN, Rennie M. Pathogenesis of Marek's disease in chicks with or without maternal antibody. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1559-1573.
31. Payne LN, Biggs PM. Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:281-302.

32. Calnek BW, Witter RL. Neoplastic Diseases, Marek's Disease In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM editors. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press, 1997:369-413.
33. Purchase HG, Clinical disease and its economic impact. In: Payne LN, editor. Marek's disease. Boston. MA. 1985:17-24.
34. Calnek BW, Shek WR, Schat KA. Spontaneous and induced herpesvirus genome expression in Marek's disease tumor cell lines. Infect Immun 1981;34:483-491.
35. Nakajima K, Ikuta M, Naito S, Ueda S, Kato S, Hirai K. Analysis of Marek's disease virus serotype 1 specific phosphorylated polypeptides in virus infected cells and Marek's disease lymphoblastoid cells. J Gen Virol 1987;68:1379-1390.
36. Powell PC, Payne LN, Frazier JA, Rennie M. T lymphoblastoid cell lines from Marek's disease lymphomas. Nature 1974;251:79-80.
37. Calnek BW, Shek WR, Schat KA. Latent infectious with Marek's disease virus and turkey herpesvirus. J Natl Cancer Inst 1981;66:585-590.
38. Kitamoto N, Ikuta K, Kato S, Wataki K. Demonstration of cells with Marek's disease tumor associated surface antigen in chicks infected with herpesvirus of turkey, 01 strain. Biken J 1979;22:137-142.
39. Powell PC, Rennie M. Failure of attenuated Marek's disease virus and herpesvirus of turkey antigens to protect against the JMV Marek's disease derived transplantable tumor. Avian Pathol 1984;9:193-200.

40. McColl K, Calnek BW, Harris WV, Schat KA, Lee LF. Expression of a putative tumor-associated antigen on normal versus Marek's disease virus transformed lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:991-1000.
41. Shek WR, Calnek BW, Schat KA, Chen C. Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: Discrimination between cytolytically and latently infected cells. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:485-491.
42. Payne LN, Roszkowski J. The presence of immunologically uncommitted bursa and thymus dependent lymphoid cells in the lymphomas of Marek's disease. *Avian Pathol* 1973;1:27-34.
43. Calnek BW, Schat KA, Ross LJ, Shek WR, Chen C. Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. I. In vivo infection. *J Cancer Inst* 1984;33:289-398.
44. Calnek BW, influence or age at exposure on the pathogenesis of Marek's disease. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:929-939.
45. Sharma JM, Witter RL, Burmester BR. Pathogenesis of Marek's disease in old chickens: Lesion regression as the basis for age-related resistance. *Infect Immun* 1973; 81:715-724.
46. Hudson L, Payne LN. An analysis of the T and B cells of Marek's disease lymphomas of the chicken. *Nature* 1973;241:52-53.
47. Burgess S, Davison F. Disease Herpesvirus-Induced Lymphomas: Recognition by the Monoclonal Antibody AV37. *J Virol* 2002;76:7276-7292
48. Siccardi FJ, Burmester BR. The differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease. *USDA Tech Bull* 1412, Washington, DC.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

49. Burgess S, Young B, Baaten B, Hunt L, Ross L, Parcells M, Kumar P, Tregaskes C, Lee L, Davidson T. Marek's disease is a natural model for lymphomas overexpressing Hodgkin's disease antigen (CD30). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:13879-84.
50. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues and Disease: principles of general pathology*. 1996
51. Compendio de cáncer 2000. Primera edición 2002. Dirección general de Epidemiología
52. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patología estructural y funcional*. 6th ed. USA: Blackwel Science, 1999.
53. Devita VT, Jr., Serpick AA, Carbone PP. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* 1970;73:881-895.
54. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, De Lena M, Uslenghi C. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer* 1975;36:252-259.
55. Lucas JB, Hoppe RT, Horwitz SM, Breslin S, Horning SJ. Rituximab is active in lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Blood* 2000;96:831a.
56. Lymphoma Study Group (1984-87). Major prognostic factors of patients with adult T-cell leukemia-lymphoma: A cooperative study. *Leuk Res* 1991;15:81-90.

57. Taguchi H, Kinoshita K, Takatsuki K, et al. An intensive chemotherapy of adult T-cell Leukemia/lymphoma: CHOP followed by etoposide, vindesine, ranimustine, and mitoxantrone with granulocyte colony-stimulating factor support. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;12:182-186.
58. Gill PS, Harrington W, Kaplan MH. Treatment of adult Tcell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N Engl J Med* 1995;332:1744-1748.
59. Waldmann TA, White JD, Goldman CK, et al. The interleukin-2 receptor: A target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus-I-induced adult T-cel leukemia. *Blood* 1993;82:1701-1712.
60. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev* 1992;11:96-103.
61. Patel T, Gores GJ, Kaufman SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996;10:587-597.
62. Kerr, JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
63. Skalka M, Matyasova J, Cejkova M. DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett* 1976;72:271-275.
64. Willie AH. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.

65. Harvey NL, Butt AJ, Kumar S. Functional activation of Nedd2/ICH-1 (Caspase-2) is an early process in apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272:13:134-139.
66. Thornberry NA, Peterson EP, Zhao JJ, Howard AD, Friffin PR, Chapman KT. Inactivation of interleukin-1^β converting enzyme by peptide (acyloxy) methyl ketones. *Biochemistry* 1994;33:3934-3940.
67. Barge RMY, Willmze R, Vandenabeele P, Fiers W, Beyaert R. Differential involvement of caspases in apoptosis of myeloid leukemic cells induced by chemotherapy versus growth factor withdrawal. *FEBS Lett* 1997;409:207-210.
68. Cooper BJ. Disease at the cellular level In: Slauson DO, Cooper BJ editors. *Mechanisms of Disease. A textbook of comparative general pathology.*
69. Lazebnik Y, Kaufmann S, Desnoyers S, Poirier G, Earnshaw W. Reconstitution of the apoptotic cascade in vitro: Pivotal role for price, a protease resembling interleukin - 1^β converting enzyme and demonstration that poly(ADP ribose) polymerase is a substrate for this enzyme during apoptosis. *Nature* 1994;371:346-347.
70. Robertson J, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: Nuclear Events in Apoptosis. *J Struct Biology* 2000;129:346-358.
71. Woo M, Hakem R, Soengas M, Duncan G, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Koufmann S, Howard T, Lowe S, Mak T. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 1998;12:806-819.

72. Oberhammer F, Wilson J, Dive C, Morris I, Hichman J, Wakeling A, Walker P, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993;12:3679-3684.
73. Janicke R, Sprengard M, Wati M, Porter A. Caspase 3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:9357-9360.
74. Nicholson D. Caspase structure, proteolytic substrates, and functions during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-1042.
75. Casiola-Rosen L, Nicholson D, Chong T, Rowan K, Thornberry N, Miller D, Rosen A. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: A fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996;183:1957-1964.
76. Truco C, Oliver F, de Murcia G, Menissier de Murcia J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase deficient cell lines. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2644-2649.
77. Enari M, Sakahira H, Yookoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:434-450.
78. Liu X, Zou H, Slauter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase 3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-184.
79. Mitamura S, Ikawa H, Mizuno N, Kaziro Y, Itoh H. Cytosolic nuclease activated by caspase 3 is inhibited by DFF-45. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:480-484.

80. Tang D, Kidd V. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:28549-28552.
81. Lui X, Li P, Widlak P, Zou H, Lou X, Garrard W, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:841-846.
82. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004;4:177-181.
83. Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-763.
84. Mihara M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003;11:577-590.
85. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
86. Hoockenbery DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci* 1994;18:51-55.
87. White E. Life, death and the pursuit of apoptosis. A review. *Gene Dev* 1996;19:1-15.
88. Yang F, Korsmeyer SK. Molecular thanatopsis. A discourse on the bcl-2 family and cell death. *Biologist* 1996;88:386-401.

89. Ruiz L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención en trámite, SECOFI 18801. P.I. (1990). Patente, Enero 26, (1994) No. 172967.
90. Ruiz L. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención en trámite, SECOFI 18802. P.I. (1990). Patente, diciembre 9, (1993) No. 172248.
91. Gómez C, de la Garza J, Arenas F, Ruiz L, Gracia I. Quimiosensibilidad *in vitro* en células de cáncer cérvico-uterino por efecto de Casiopeinas I, II, III. Tumor 1993;6:4,76.
92. Gracia I, Ruiz L, Gómez C, Tinoco M, Márquez A, Romero L, Hernández A, Macías L, Bravo M. Knigth's move in the periodic table, from cooper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. Metal Based Drugs 2001;8:1,19-28.
93. Ruiz L, Gracia I, de la Rosa M, Sumano H, Gómez C, Arenas F, Gómez E, Pimentel E, Cruces M. Cytostatic, Mutagenic, Antineoplastic activities and preliminary toxicity of copper (II) new drugs: Casiopeina I, II, III. J Inorg Biochem 1993;51(1-2)406.
94. Trejo C, Palencia G, Gracia I, Zúñiga S, Rodríguez A, Osorio L, Márquez L, Sánchez A, Moreno M, Cruz A, Bravo M, Ruiz L, Sotelo J. Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase dependent ad caspase independent mechanisms. Neoplasia 2005;7:563-574.
95. Casaubón M. Necropsia de las aves. En: De Aluja A, Constantino F, editors. Técnicas de necropsia en animales domésticos. México:Manual Moderno, 2002:49-58.

96. Allen T. Hematoxilina y Eosina. In: Heffess C, Mullick F, editors. Métodos Histotecnológicos. Washington:ARP,1995:55-58.
97. Burmester BR, Witter RL. An outline of the common neoplastic diseases of the chicken. US Dep Agric. Agric Res Serv. Production Research Report. 1971;129.
98. Settnes OP. Marek's disease, a common naturally herpesvirus -induced lymphoma of the chicken. Nord Veterinaermed 1982;34:1-132.
99. Ianconescu M, Perk K, Zimber A, Yaniv A. Reticuloendotheliosis and lymphoproliferative disease of turkeys. Pathology and differential diagnosis. Ref Vet 1979;36:2-12.
100. Pope CR. Lymphoid System. In: Riddell, editor. Avian Histopathology. Florida, Rose Printing 1996:17-44.
101. Gimeno IM, Witter RL, Ree WN. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. Avian Dis 1999;43,4:721-37.
102. Chabner B, Allegra C, Curt G, Calabresi P. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. In Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman A, editors. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill Interamericana, 1996; 1301-1368.
103. Huschtscha L, Bartier W, Malstrom A, Tattersal M. Cell death by apoptosis following anticancer drug treatment *in vitro*. Int J Oncol 1995;6:585-593.
104. Carmody R, McGowan A, Cotter T. Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis *in vitro*. Exp Cell Res 1999;248:520-530.

105. Willie AH, Foreword. In: Hickmann JA, Dive C, editors. Apoptosis and Cancer Chemotherapy. New Jersey:Humana Press Inc. 1999:v-vii.
106. Debatin KM. Role of CD95 (APO-1/Fas) System in Chemotherapy. In: Hickmann JA, Dive C, editors. Apoptosis and Cancer Chemotherapy. New Jersey:Humana Press Inc. 1999:175-187.
107. Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. Blood 1997;89:1845-1853.
108. Debatin KM. Cytotoxic Drugs, programmed cell death, and the immune system: defining new roles in an old play. J Natl Cancer Inst 1997;89:750-751.
109. Miceau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche- Boitrel M. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to Fas Mediated cytotoxicity. J Natl Cancer Inst 1997;89:783-789.
110. Yoshihiro K, Zhou Y, Zhang X, Chen T, Tanaka S, Asuma E, Sakurai M. Fas/APO1 (CD95) mediated cytotoxicity is responsible for the apoptotic cell death of leukaemic cells induced by interleukin-2 activated T cells. Br J Haematol 1997;96:147-157.

Anexo A.

Dosis letal 50

Con la finalidad de determinar la dosis terapéutica a usar en el tratamiento de las gallinas se realizó un ensayo para conocer la dosis letal en el 50% de la población (DL_{50}) de la Casiopeína[®] III ia en esta especie. Se conformaron seis grupos de cinco gallinas de la estirpe Cobb de 30 semanas de edad. A cada integrante del grupo se le administró lentamente su dosis correspondiente por vía intravenosa y sólo se consideraron a aquellos animales que murieron durante las primeras 24 horas (Ver Cuadro). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Log Probit Analysis y se determinó la DL_{50} en 0.95mg/kg ($P < 0.05$).

| Dosis (mg/kg) | Respuesta | Respuesta neta |
|---------------|-----------|----------------|
| 0.5 | 0 | 0 |
| 0.7 | 0 | 0 |
| 0.9 | 40 | 40 |
| 1.1 | 80 | 79.99 |
| 1.3 | 100 | 100 |
| 1.5 | 100 | 100 |

Prueba de homogeneidad

| Respuesta | Esperada | Chi – cuadrada |
|-----------|-----------|----------------|
| 0 | 0.000122 | 0.000000 |
| 0 | 1.209414 | 1.914220 |
| 40 | 33.917984 | 1.850372 |
| 80 | 85.407051 | 2.345764 |
| 100 | 98.859962 | 1.703188 |
| 100 | 99.955658 | 0.000000 |

Chi cuadrada total = 7.8156748

Grados de libertad = 4

Número de ciclos = 7

Varianza de la pendiente = 1.988720

Varianza de la intercepción = 0.008662

Factor de heterogeneidad = 1.593386

Anexo B

Procedimiento de Hematoxilina y Eosina de Harris

Fijación: Formalina neutra al 10%, estabilizada

Secciones: En parafina

Soluciones:

Alcohol ácido al 1% (C.3)

Agua amoniacal (C.3)

Solución saturada de carbonato de litio (C.3)

Solución de eosina – floxina

Combinar en un cilindro de 1000mL

Solución matriz de eosina.....100.0mL

Solución matriz de floxina.....10.0mL

Etanol al 95%.....780.0mL

Ácido acético, glacial.....4.0mL

La solución puede usarse por aproximadamente una semana.

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina.....5.0g

Etanol al 100%.....50.0mL

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Alumbre de potasio o de amonio..... | 100.0g |
| Agua destilada..... | 1000.0mL |
| Óxido rojo de mercurio..... | 2.5g |

Usar un frasco de 2000mL para el alumbre y el agua, y uno más pequeño para el etanol y la hematoxilina. Disolver completamente el alumbre en el agua destilada con la ayuda de calor y de un agitador magnético. Agitar vigorosamente para disolver la hematoxilina en alcohol a temperatura ambiente. Remover el alumbre y el agua destilada de la fuente de calor. Combinar las dos soluciones lentamente. Una vez combinadas las soluciones regresarlas a la fuente de calor. Hervir la mezcla tan rápido como sea posible. Remover del calor y añadir lentamente el óxido de mercurio. Devolver la solución a la fuente de calor hasta que se torne de color púrpura oscuro. Remover del calor la solución y colocarla en un recipiente con agua fría hasta que baje la temperatura. Añadir 20mL de ácido acético glacial para intensificar la tinción nuclear. Filtrar la solución antes de usarse.

Procedimiento

1. Desparafinizar las laminas e hidratar hasta llegar al agua destilada.
2. Teñir en hematoxilina de Harris, filtrada recientemente, de 6-15 minutos.
3. Lavar con agua corriente entre 2-5 minutos.
4. Diferenciar en alcohol ácido al 1%, 1-2 remojones.
5. Lavar brevemente en agua corriente.

Secuencia de tinción

Xileno

Xileno

Alcohol 100%

Alcohol 100%

Alcohol 95%

Alcohol 95%

Alcohol 80%

Agua destilada

Hematoxilina de Harris

Lavado en agua corriente

Agua destilada

Alcohol 80%

Eosina Floxina

Alcohol 95%

Alcohol 95%

Alcohol 100%

Alcohol 100%

Xileno

Xileno

Allen T. Hematoxilina y Eosina en: Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L, editores. Métodos Histotecnológicos. ARP y AFIP, 1995:55-58.

Anexo C.

Procedimiento de Inmunohistoquímica

Desparafinización y rehidratación

Las secciones fueron sumergidas en xileno por 5 minutos, posteriormente fueron lavadas y colocadas en etanol al 95% por tres minutos. Se repitió este último proceso cuatro veces. Después del lavado las secciones se mantuvieron en agua destilada por 30 segundos.

Recuperación del antígeno

Las secciones fueron calentadas en microondas por 10 minutos en ácido cítrico 0.01 Mol y pH 6.0.

Protocolo de tinción

Paso 1: se cubrieron las secciones con peróxido de hidrógeno al 3% por 5 minutos tras los cuales se procedió a lavarlas con agua destilada.

Paso 2: se aplicaron los anticuerpos primarios policlonales caprinos, contra caspasa 3 activada p20 (L-18): sc- 1225 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) a una dilución de 1:50. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con agua.

Paso 3: después de retirar el amortiguador se aplicó el anticuerpo secundario por 15 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el lavado realizado en el paso 2.

Paso 4: se aplicaron las gotas de estreptavidina hasta cubrir la sección completamente. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se realizó una vez más un lavado.

Paso 5: se cubrieron las secciones con la solución de sustrato-cromógeno DAKO® *Large Volume* DAB+ (diaminobenzidina), Code No. K3468 por 30 minutos y posteriormente se lavaron con agua destilada.

Paso 6: se sumergieron las secciones en hematoxilina de Mayer durante 2 minutos. Se lavaron con agua destilada. Posteriormente se deshidrataron y se cubrieron para su valoración en el microscopio de luz.

El procedimiento se llevo a cabo usando el robot *DakoCytomation Autostainer Universal Staining System*.

Anexo D

TUNEL

Desparafinización y rehidratación

Las laminillas con las muestras fueron sumergidas en xylene por 5 minutos, posteriormente fueron lavadas y se colocaron en etanol al 95% por tres minutos. Se repitió este último proceso cuatro veces. Después del lavado las muestras se mantuvieron en agua destilada por 30 segundos.

Procedimiento

Paso 1: Se inactivo la peroxidasa endógena mediante el *Peroxidase Block* – Dako Code K 4007

Paso 2: lavado de secciones

Paso 3: se colocó la proteinasa K, Código No. S3020 sobre las muestras y se incubaron por 30 minutos a 37°C.

Paso 4: lavado de secciones

Paso 5: se permeabilizaron las secciones por 2 minutos en hielo.

Paso 6: se añadió la mezcla de reacción de TUNEL y se incubó por 60 minutos a 37°C.

Paso 7: lavado de secciones

Paso 8: añadió la antifluorescencia POD y se incubó por 30 minutos a 37°C.

Paso 9: lavar las láminas

Paso 10: colocar el sustrato e incubar por 5 a 20 minutos a temperatura ambiente

Paso 11: analizar en microscopio de luz.

Anexo E

Cuadro 6.2.1.1. Índice mitótico en secciones de hígado con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | N | No de caso | n |
| T1 | 5.2 | E2 | 5.2 |
| T2 | 6.5 | E3 | 3.5 |
| T3 | 3.8 | E4 | 5.4 |
| T4 | 5.2 | E5 | 6.2 |
| T5 | 3.5 | E6 | 5.2 |
| T6 | 2.2 | E7 | 6.5 |
| T7 | 3.1 | E9 | 4.2 |
| T8 | 3.8 | E10 | 5.2 |
| T9 | 7.5 | E15 | 4.2 |
| T10 | 6.6 | E16 | 3.5 |
| T12 | 4.8 | E17 | 5.2 |
| T15 | 4.2 | E19 | 3.5 |
| - | - | E20 | 5.4 |

Cuadro 6.2.1.2. Índice mitótico en las secciones de proventrículo con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | N | No de caso | n |
| T3 | 5.5 | E4 | 5.3 |
| T4 | 5.5 | E5 | 4.8 |
| T6 | 6.5 | E6 | 5.5 |
| T8 | 5.3 | E7 | 5.5 |
| T9 | 4.8 | E10 | 5.4 |
| T15 | 5.1 | E12 | 5.1 |
| T17 | 5.4 | E14 | 4.8 |
| | | E15 | 4.9 |
| | | E17 | 5.6 |

Cuadro 6.2.1.3. Índice mitótico en las secciones de bazo con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T3 | 4.8 | E3 | 6.1 |
| T4 | 4.2 | E4 | 5.4 |
| T6 | 5.3 | E12 | 5.8 |
| T10 | 7.5 | E17 | 6.1 |
| T15 | 6.5 | | |
| T17 | 8.5 | | |

Cuadro 6.2.1.4. Índice mitótico en las secciones de riñón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 2.8 | E5 | 4.5 |
| T2 | 7.5 | E6 | 5.2 |
| T3 | 5.2 | E15 | 3.2 |
| T7 | 5.8 | E16 | 5.2 |
| T8 | 4.2 | E17 | 4.1 |
| T10 | 3.8 | E20 | 4.8 |
| T12 | 5.5 | | |
| T14 | 7.5 | | |

Cuadro 6.2.1.5. Índice mitótico en las secciones de corazón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T3 | 3.8 | E7 | 4.8 |
| T6 | 5.6 | E12 | 3.8 |
| T7 | 4.8 | E15 | 5.2 |
| T10 | 3.5 | E17 | 3.8 |
| T12 | 2.7 | E20 | 3.8 |
| T15 | 4.8 | | |
| T17 | 7.5 | | |

Cuadro 6.2.1.6. Índice mitótico en las secciones de pulmón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|---|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 3.5 | E7 | 5 |
| T2 | 4.5 | E12 | 4 |
| | | E16 | 3 |
| | | E17 | 3 |

Cuadro 7.2.1.7. Índice mitótico en las secciones de ovario con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T4 | 5.5 | E3 | 5.5 |
| T7 | 4.8 | E15 | 4.8 |
| - | - | E17 | 4.7 |

Cuadro 6.2.1.8. Índice mitótico en las secciones de mesenterio con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|---|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| - | - | E7 | 2.4 |
| - | - | E12 | 2.8 |

Cuadro 6.2.1.9. Índice mitótico en las secciones de intestino con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T4 | 5.2 | E12 | 4.2 |
| T7 | 5 | | |
| T9 | 4.8 | | |

Cuadro 6.2.1.10. Comparación de las medias de los índices mitóticos de los grupos tratados y testigo

| Tejido | Testigo | | Tratado | |
|---------------|-------------------|------|-------------------|------|
| | media | ee | media | Ee |
| Hígado | 4.70 ^a | 0.45 | 4.86 ^a | 0.28 |
| Proventrículo | 5.44 ^a | 0.20 | 5.21 ^a | 0.11 |
| Bazo | 5.85 ^a | 0.17 | 6.13 ^a | 0.68 |
| Riñón | 5.29 ^a | 0.59 | 4.50 ^a | 0.31 |
| Corazón | 4.67 ^a | 0.60 | 4.28 ^a | 0.30 |
| Pulmón | 4 ^a | 0.50 | 3.75 ^a | 0.92 |
| Ovario | 5.15 ^a | 0.35 | 5 ^a | 0.25 |

ee: error estandar

a: Sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Inmunohistoquímica

Cuadro 6.3.1. Índice de activación de caspasa 3 en secciones de hígado con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 3.2 | E2 | 3.8 |
| T2 | 3.5 | E3 | 3.6 |
| T3 | 2.8 | E4 | 3.3 |
| T4 | 3.4 | E5 | 3.5 |
| T5 | 2.8 | E6 | 3.4 |
| T6 | 2.9 | E7 | 3.5 |
| T7 | 3.1 | E9 | 3.7 |
| T8 | 3.4 | E10 | 3.5 |
| T9 | 3.2 | E15 | 3.2 |
| T10 | 3.4 | E16 | 3.5 |
| T12 | 3.8 | E17 | 3.3 |
| T15 | 3.5 | E19 | 3.5 |
| - | - | E20 | 3.4 |

Cuadro 6.3.2. Índice de activación de caspasa 3 en secciones de proventrículo con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T3 | 3.3 | E4 | 3.1 |
| T4 | 3.3 | E5 | 3.5 |
| T6 | 3.3 | E6 | 3.2 |
| T8 | 3.5 | E7 | 3.1 |
| T9 | 3.2 | E10 | 3.5 |
| T15 | 3.5 | E12 | 3.3 |
| T17 | 3.5 | E14 | 3.5 |
| | | E15 | 3.5 |
| | | E17 | 3.2 |

Cuadro 6.3.3. Índice de activación de caspasa 3 en secciones de bazo con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T3 | 3.1 | E3 | 4.5 |
| T4 | 3.2 | E4 | 3.5 |
| T6 | 2.8 | E12 | 2.2 |
| T10 | 2.7 | E17 | 2.5 |
| T15 | 3 | | |
| T17 | 2.4 | | |

Cuadro 6.3.4. Índice de activación de caspasa 3 en secciones de riñón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|---|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 3.8 | E5 | 4 |
| T2 | 3.5 | E6 | 3 |
| T3 | 3.7 | E15 | 3 |
| T7 | 4 | E16 | 5 |
| T8 | 3.2 | E17 | 3 |
| T10 | 3.8 | E20 | 4 |
| T12 | 3.8 | | |
| T14 | 3.9 | | |

Cuadro 6.3.5. Índice de activación de caspasa 3 en las secciones de corazón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T3 | 3.5 | E7 | 3.1 |
| T6 | 3.4 | E12 | 3.3 |
| T7 | 2.8 | E15 | 2.8 |
| T10 | 2.8 | E17 | 3.1 |
| T12 | 3.3 | E20 | 2.8 |
| T15 | 3.5 | | |
| T17 | 3.5 | | |

Cuadro 6.3.6. Índice de activación de caspasa 3 en secciones de pulmón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 3.1 | E7 | 3.2 |
| T2 | 3.3 | E12 | 2.8 |
| | | E16 | 2.2 |
| | | E17 | 3.8 |

Cuadro 6.3.7. Índice de activación de caspasa 3 en secciones de ovario con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|-----|---------------|-----|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T4 | 4.2 | E3 | 4.8 |
| T7 | 3.8 | E15 | 2.8 |
| - | - | E17 | 3.2 |

Cuadro 6.3.8. Comparación de las medias de los índices de activación de caspasa 3 de los grupos tratados y testigo

| Tejido | Testigo | | Tratado | |
|---------------|-------------------|------|-------------------|------|
| | media | ee | media | ee |
| Hígado | 3.25 ^a | 0.09 | 3.48 ^a | 0.05 |
| Proventrículo | 3.37 ^a | 0.05 | 3.32 ^a | 0.06 |
| Bazo | 2.87 ^a | 0.12 | 3.18 ^a | 0.52 |
| Riñón | 3.71 ^a | 0.09 | 3.67 ^a | 0.33 |
| Corazón | 3.26 ^a | 0.12 | 3.03 ^a | 0.10 |
| Pulmón | 3.20 ^a | 0.10 | 3 ^a | 0.34 |
| Ovario | 4 ^a | 0.20 | 3.60 ^a | 0.61 |

ee: error estandar

a: Sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

TUNEL

6.4.1. Índice de fragmentos de DNA 3'OH en secciones de hígado con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|------|---------------|------|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 0.21 | E7 | 0.23 |
| T2 | 0.3 | E12 | 0.25 |
| T3 | 0.25 | E15 | 0.28 |
| T4 | 0.22 | E17 | 0.21 |
| T5 | 0.2 | E20 | 0.25 |

6.4.2. Índice de fragmentos de DNA 3'OH en secciones de corazón con linfoma

| Grupo testigo | | Grupo tratado | |
|---------------|------|---------------|------|
| No de caso | n | No de caso | n |
| T1 | 0.25 | E7 | 0.28 |
| T2 | 0.15 | E12 | 0.2 |
| T3 | 0.23 | E15 | 0.28 |
| T4 | 0.22 | E17 | 0.22 |
| T5 | 0.18 | E20 | 0.18 |

6.4.3. Comparación de las medias de los índices de fragmentos de DNA 3'OH de los grupos tratados y testigo

| Tejido | Testigo | | Tratado | |
|---------|-------------------|------|-------------------|------|
| | media | ee | media | ee |
| Hígado | 0.24 ^a | 0.02 | 0.24 ^a | 0.01 |
| Corazón | 0.21 ^a | 0.02 | 0.23 ^a | 0.02 |

ee: error estandar

a: Sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)