



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN.

**“DETECCIÓN DEL GRADO DE MUERTE CELULAR
PROGRAMADA (APOPTOSIS) EN EL APARATO
REPRODUCTOR DE MACHOS CAPRINOS INFECTADOS CON
EL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA (AEC).”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

ALMA NOEMI MONTES DE OCA CHÁVEZ.

ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRIGUEZ.

COASESOR: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO



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.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo a Dios por mi existencia.

A mi madre por que sin ella no hubiera llegado hasta aquí.

A mi abuelita y a mi tía por ser como mis segundas madres.

A mi tío Alfredo por ser el único padre que he conocido.

A mis compañeros del Laboratorio de Virología: Lulù, Mirna y Hugo por su apoyo, su amistad y sus consejos.

Al Dr. Juan Antonio Montaraz por ser mi asesor y ayudarme a la realización de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Martínez por ser mi asesor y guía para la realización de esta tesis.

Al Dr. Benito López Baños por su ayuda para la realización del análisis de resultados de esta tesis.

Al MVZ Germán Garrido por su ayuda y sus consejos para la realización del presente trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma han estado involucradas en mi crecimiento y desarrollo como un mejor ser humano.

De todo corazón muchas gracias a todos.

INDICE DE TESIS

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I | |
| RESUMÉN..... | 5 |
| INTRODUCCIÓN | |
| a) Antecedentes de la Artritis Encefalitis Caprina (AEC) | |
| • Definición..... | 6 |
| • Etiología..... | 6 |
| • Transmisión..... | 6 |
| • Signos clínicos..... | 6 |
| • Diagnóstico..... | 7 |
| • Diagnóstico diferencial..... | 7 |
| • Prevención..... | 7 |
| • Control..... | 8 |
| b) Apoptosis..... | 8 |
| • Diferencias entre necrosis y Apoptosis..... | 14 |
| • Receptores de membrana celular que median la Apoptosis..... | 15 |
| • Genes Bcl-2 y Bcl-X en la regulación de la Apoptosis..... | 16 |
| • Otros genes que están involucrados en el proceso de Apoptosis..... | 17 |
| • Mecanismos bioquímicos de la Apoptosis..... | 17 |
| • Papel de la Apoptosis en el Sistema Inmune..... | 18 |
| • El mecanismo de Apoptosis y su relación con las mitocondrias..... | 19 |
| • Mecanismos que utilizan las mitocondrias para disparar la muerte celular programada..... | 20 |
| • Apoptosis y virus..... | 13 |
| CAPÍTULO II | |
| OBJETIVO GENERAL..... | 24 |
| OBJETIVO PARTICULAR..... | 24 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 24 |
| CAPÍTULO III | |
| HIPÓTESIS..... | 25 |
| CAPÍTULO IV | |
| Material biológico..... | 26 |
| Material no biológico..... | 26 |
| Metodología para el desarrollo de la prueba..... | 27 |
| Análisis estadístico..... | 28 |
| CAPÍTULO V | |
| RESULTADOS..... | 29 |
| CAPÍTULO VI | |
| DISCUSIÓN..... | 37 |
| CAPÍTULO VII | |
| CONCLUSIÓN..... | 39 |
| CAPÍTULO VIII | |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 40 |
| CAPÍTULO IX | |
| ANEXO..... | 46 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| I. Enfermedades asociadas a inhibición de Apoptosis..... | 14 |
| II. Enfermedades asociadas a aumento de Apoptosis..... | 14 |
| III. Diferencias entre necrosis y Apoptosis..... | 15 |
| IV. Proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas..... | 19 |
| V. Número de células apoptóticas (%)...... | 30 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1. Cambios morfológicos en la muerte celular programada..... | 10 |
| 2. Potenciadores, Inhibidores, Efectores e Inductores de la Apoptosis..... | 12 |
| 3. Representación esquemática de las fallas centrales de la muerte celular programada..... | 13 |
| 4. Aspectos Bioquímicos de la Apoptosis..... | 18 |
| 5. Especies de Oxígeno reactivo y su rol en la Apoptosis..... | 22 |
| Ia. Bazo. Control negativo. Túnel..... | 32 |
| Ib. Bazo. Control negativo. H.E..... | 32 |
| IIa. Pulmón. Control positivo. Túnel..... | 32 |
| IIb. Pulmón. Control positivo. H.E..... | 32 |
| Ia. Ámpula. 46 células apoptóticas. Animales IN. Túnel..... | 33 |
| Ib. Ámpula. Animales Infectados naturalmente. H.E..... | 33 |
| Ic. Glándula bulbouretral. 11 cel. Apop. Animales IN. Túnel..... | 33 |
| Id. Glándula bulbouretral. Animales IN. H.E..... | 33 |
| IIIa. Vesícula seminal. 28 cel. Apop. Animales IN. Túnel..... | 33 |
| IIIb. Vesícula seminal. Animales IN. H.E..... | 33 |
| IVa. Ámpula. 23 cel. Apop. Animales IN. Túnel..... | 33 |
| IVb. Ámpula. Animales IN. H.E..... | 33 |
| Ia. Glándula bulbouretral. 29 cel. Apop. Animales FESC. Túnel..... | 34 |
| Ib. Glándula bulbouretral. Animales FESC. H.E..... | 34 |
| Ic. Vesícula seminal. 65 cel. Apop. Animales FESC. Túnel..... | 34 |
| Id. Vesícula seminal. Animales FESC. H.E..... | 34 |
| IIa. Ámpula. 11 cel. Apop. Animales FESC. Túnel..... | 34 |
| IIb. Ámpula. Animales FESC. H.E..... | 34 |
| IIc. Vesícula seminal. 66 cel. Apop. Animales FESC. Túnel..... | 34 |
| IId. Vesícula seminal. Animales FESC. H.E..... | 34 |
| Ia. Vesícula seminal. 124 cel. Apop. Animales ATCC. Túnel..... | 35 |
| Ib. Vesícula seminal. Animales ATCC. H.E..... | 35 |
| IIa. Ámpula. 15 cel. Apop. Animales ATCC. Túnel..... | 35 |
| IIb. Ámpula. Animales ATCC. H.E..... | 35 |
| IIc. Vesícula seminal. 56 cel. Apop. Animales ATCC. Túnel..... | 35 |
| IId. Vesícula seminal. Animales ATCC. H.E..... | 35 |
| Ia. Glándula bulbouretral. 44 cel. Apop. Animales neg. Túnel..... | 36 |
| Ib. Glándula bulbouretral. Animales negativos. H.E..... | 36 |
| IIa. Glándula bulbouretral. 2 cel. Apop. Animales neg. Túnel..... | 36 |
| IIb. Glándula bulbouretral. Animales negativos. H.E..... | 36 |
| IIc. Ámpula. 26 cel. Apop. Animales neg. Túnel..... | 36 |
| IId. Ámpula. Animales negativos. H.E..... | 36 |

RESUMÉN

El virus de Artritis Encefalitis Caprina, un retrovirus es causante de una infección natural en cabras. El objetivo del presente trabajo fue demostrar el grado de apoptosis (muerte celular programada) producido por el virus de Artritis Encefalitis Caprina en glándulas anexas del aparato reproductor de machos caprinos. Para cumplir con dicho objetivo se realizaron cortes en parafina de ámpula, glándula bulbouretral y vesícula seminal del aparato reproductor de machos caprinos infectados con este virus y también negativos a dicho virus; se les analizó por medio de un Kit (In Situ Death Detection Kit A.P). Esta técnica tiene como principio: Marcar con fluoresceína todas aquellas células que presentan ruptura de su DNA mediante la activación de una endonuclease endógena nuclear dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta enzima selecciona sitios rotos de DNA localizados entre las unidades nucleosomales generando fragmentos de DNA localizados entre las unidades nucleosomales. Estas fibras de DNA rotas pueden ser identificadas con un marcador libre de 3'-OH terminal con nucleótidos modificados en una reacción enzimática. Los resultados fueron analizados con una prueba estadística denominada Prueba de Friedman; dicho análisis concluyó que no existe diferencia significativa entre órganos y tampoco entre grupos.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES DE LA ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA (AEC).

DEFINICIÓN.

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) es una enfermedad viral que afecta a los caprinos de todas las edades y de ambos sexos. Se caracteriza por encefalitis en los cabritos y artritis anquilosante e insidiosa en las cabras adultas (Adams *et al*, 1980 a; Narayan *et al*, 1980, Narayan *et al*, 1984 Sherman, 1978).

Esta enfermedad afecta aparatos o sistemas de caprinos domésticos de todas las edades y razas (Crawford y Adams ,1981; Dunn, 1990; Trigo, 1991; Alvarez, 1984; Dinter y Morein, 1990, Buchan, 1996; Cork *et al*, 1974; Cork *et al*,1974 a)

ETIOLOGIA.

La Artritis Encefalitis Caprina es producida por un virus de la familia Retroviridae que pertenece al género Lentivirus. Es un virus RNA envuelto (Cheevers *et al*, 1988; Dinter y Morein, 1990; Putney *et al*, 1990; Smith , 1994; Clements *et al*, 1980; Cork *et al*, 1980).

TRANSMISIÓN.

La forma de transmisión de la enfermedad más común, ocurre cuándo el cabrito ingiere calostro o leche de madres infectadas. Sin embargo el contacto prolongado, así como la alta densidad en algunos hatos, parece tener importancia en la transmisión. En semen de machos infectados es posible encontrar partículas virales de AEC pero hasta ahora el riesgo de transmisión no esta suficientemente demostrado (Travassos, 1998)

SIGNOS CLÍNICOS.

En los cabritos entre 2-6 meses de edad se presenta una leucoencefalomielitis, hay ataxia o paresia del tren posterior, se presenta depresión, ceguera, reflejos pupilares anormales, opistotonos, tortícolis, los animales dan vueltas en círculo y presentan disfagia. Algunos cabritos sobreviven pero en su etapa adulta presentan los signos clínicos de artritis (Adams *et al*, 1980 b).

En adultos mayores de un año, se presenta la forma artrítica la cuál es una sinovitis crónica hiperplásica, observándose en la mayoría de los casos, en articulaciones carpales. El comienzo puede ser insidioso o repentino; unilateral y

bilateral. Las cabras afectadas pierden peso gradualmente, y las articulaciones a la palpación se siente una consistencia blanda, hay dolor y aumento de la temperatura. Se encuentran echadas la mayor parte del tiempo, y como resultado pueden ocurrir úlceras por decúbito. En algunos casos ocurre dilatación de la cápsula atlántica y supraespinosa (articulación del hombro). El curso de la enfermedad es largo, durando varios meses o años (Nazará, 1985; Trigo, 1991; Peturson, 1992; Heckert *et al*, 1992).

A la presentación artrítica se puede asociar una neumonía progresiva, caracterizada por dificultad para respirar después de un leve esfuerzo, para progresar a disnea, aún cuando el animal se encuentra en reposo (Robinson y Ellis, 1986).

Las cabras en lactación pueden presentar una mastitis indurativa, esta se presenta de 1 a 3 días del parto, la ubre se encuentra firme y dura, con poca producción de leche, no existe mastitis bacteriana asociada y la recuperación no es completa (Robinson y Ellis, 1986, Oliver *et al*, 1983)

DIAGNÓSTICO.

Por la signología (artritis, cojeras, emaciación, neumonías, mastitis, y en cabritos los signos nerviosos).

- Serología: técnicas de inmunodifusión en agar gel (IDAG), ELISA, Inmunoperoxidasa.
- Otros: Microscopía electrónica, Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). (Crawford y Adams, 1981; Novelo *et al*, 2000)

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Traumatismos a nivel de la columna vertebral, Listeriosis, Toxoplasmosis, Deficiencia de Cobre, Edema maligno, Micoplasmosis, Clamidiasis, Brucelosis, Estreptococosis (Adams *et al*, 1980 c; Knight y Jokienen, 1982, Cork *et al*, 1989).

TRATAMIENTO.

No existen tratamientos

PREVENCIÓN.

Con el fin de prevenir la enfermedad hay que tomar en cuenta la forma de transmisión del virus de AEC, ya que infecta células de la serie monocito-macrófago, con localización y replicación en tejidos asociados a macrófagos,

predominantemente tejido sinovial, glándula mamaria, sistema nervioso central y pulmón (Adams *et al*, 1983).

Por otro lado la ingestión de calostro o leche es la más eficiente vía de contagio del virus de AEC (Adams *et al*, 1983; Ellis *et al*, 1987; East *et al*, 1993).

CONTROL.

- Separar a los cabritos de sus madres al momento del parto para que no consuman calostro y leche que esta infectada con el virus de AEC.
- Distancia de tres metros entre animales positivos y negativos.
- Desinfectar equipo de ordeño e iniciarlo con animales negativos y terminar con positivos (Ellis *et al*, 1987; East *et al*, 1993).
- Monitorear cada 6 meses a los animales jóvenes y cada año a los adultos.
- Reemplazo progresivo de los animales infectados (Robinson *et al*, 1986; East *et al*, 1993; Gaskin, 1990, Petursson *et al*, 1992).

APOPTOSIS

La palabra “apoptosis” significa caerse (morirse) como caen los pétalos o las hojas de otoño, según los griegos (Arango, 1997; Duke, 1997).

Se denomina muerte celular programada (apoptosis) a un proceso que llevan a cabo una gran cantidad de tipos celulares que conforman el organismo de los seres vivos para autodestruirse y de esta manera conservar un equilibrio (Arango, 1997).

El termino apoptosis (apo= separar y ptosis= caer) fue propuesto y empleado en 1972 con el propósito de describir la muerte que se observaba durante el desarrollo embrionario en la regeneración hepática y la relación entre proliferación y muerte existente en modelos de tumores murinos *in vivo*, diferente a la que se ocasiona por intoxicaciones y algunas patologías.

Las observaciones de muerte celular programada (apoptosis) se remontan a principios del siglo XIX, practicadas en embriones, en los cuales se interpreto como la eliminación de ciertas poblaciones celulares que presentaban aberraciones. No fue sino hasta 1949 cuando Hamburger y Levi, con estudios cuantitativos en embriones de pollo, demostraron que aproximadamente 50% de neuronas y motoneuronas formadas durante la embriogénesis morían antes del nacimiento. Sin embargo, el mérito de Kerr *et al* en el año 1972 fue proponer que en este tipo de

muerte las células participaban activamente y que este proceso era de vital importancia para conservar la estructura celular de los tejidos (Arango, 1997, Abbas *et al*, 1995).

La apoptosis se ha conocido con otros nombres: cuerpos de Councilman (hígado), cuerpos cariolíticos (criptas intestinales), cuerpos tingibles (ganglio linfático), cuerpos de Civatte (piel), cuerpos hematoxilínicos (ovarios) (Arango, 1997).

En las células que sufren apoptosis se aprecian cambios muy distintos entre los más notables se encuentran (Formigli, 2000):

- Se encogen y se apartan de sus vecinas.
- El núcleo cambia espectacularmente durante este proceso: uno de los cambios más notables afecta a la cromatina (ADN cromosómico y proteínas) que en una situación normal esta dispersa y durante el proceso apoptótico se condensa formando una o varias manchas cerca de la membrana nuclear que semeja una media luna o herradura.
- Las células que se están muriendo y no son ingeridas pueden sufrir nuevos cambios. El núcleo se desintegra y las células se dividen en numerosos cuerpos apoptóticos que son vesículas integradas principalmente por ribosomas, mitocondrias y material nuclear. Estos cuerpos son fagocitados por células vecinas o macrófagos (Figura 1).

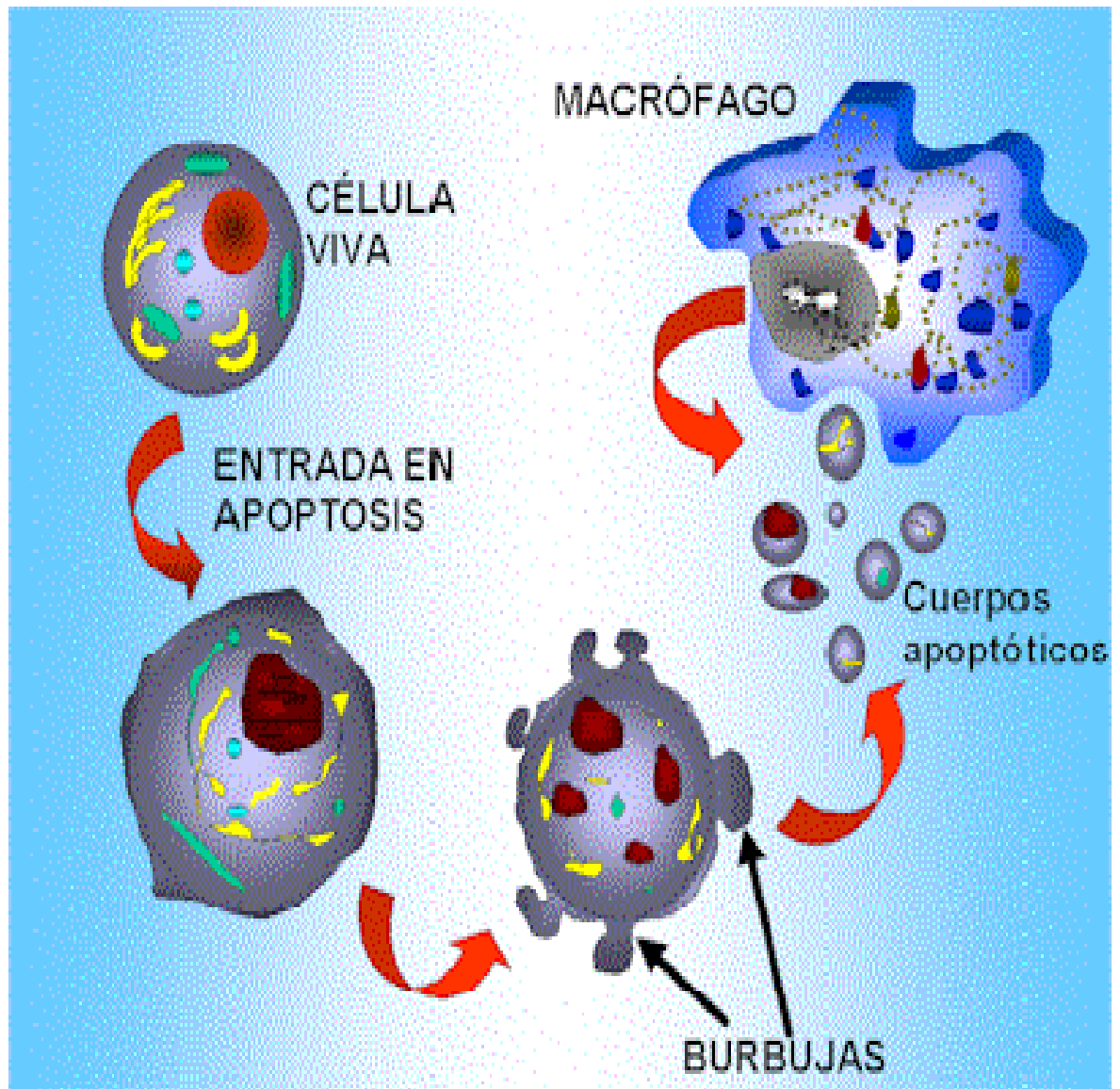


Figura 1. Exelinfo. Imágenes, 2002

El patólogo australiano John F.R. Kerr y sus colegas Andrew H. Wyllie y Alastair Currie en 1972 propusieron que una iniciación inadecuada del suicidio celular o su inhibición, podría contribuir a muchas enfermedades entre ellas el cáncer. (Formigli, 2000)

La mayoría de las células producen una serie de proteínas que utilizan como factores autodestructivos (Cohen y Duke, 1992).

La apoptosis puede activarse de varias maneras (Cohen y Duke, 1992):

- Cuando una célula deja de percibir las señales químicas (factores de crecimiento o supervivencia).
- Cuando una célula recibe mensajes externos o internos que anulan las señales anteriores.
- Cuando las células reciben señales contradictorias sobre si pueden o no dividirse.

Las quemaduras solares por ejemplo, pueden provocar apoptosis en los queratinocitos que aún no han llegado al estrato queratinizado en la piel (Duke, 1997).

Las armas autodestructivas o suicidas de las que hablábamos anteriormente son unas enzimas que degradan proteínas las cuales se denominan enzimas transformadoras de la interleucina I (ICE) (Duke, 1997).

Cuando las enzimas se activan destruyen otras proteínas y con ello las células. Algunas de las proteínas degradadas son componentes estructurales esenciales de la célula. En otros casos, los cortes producidos por las proteínas conducen directa o indirectamente a la destrucción del material genético impidiendo el propio mantenimiento de la célula. A pesar de que todas las células tienen la misma maquinaria letal las señales que llevan a la autodestrucción de unas y otras pueden ser distintas (Keer y Willie, 1972) (Figura 2).

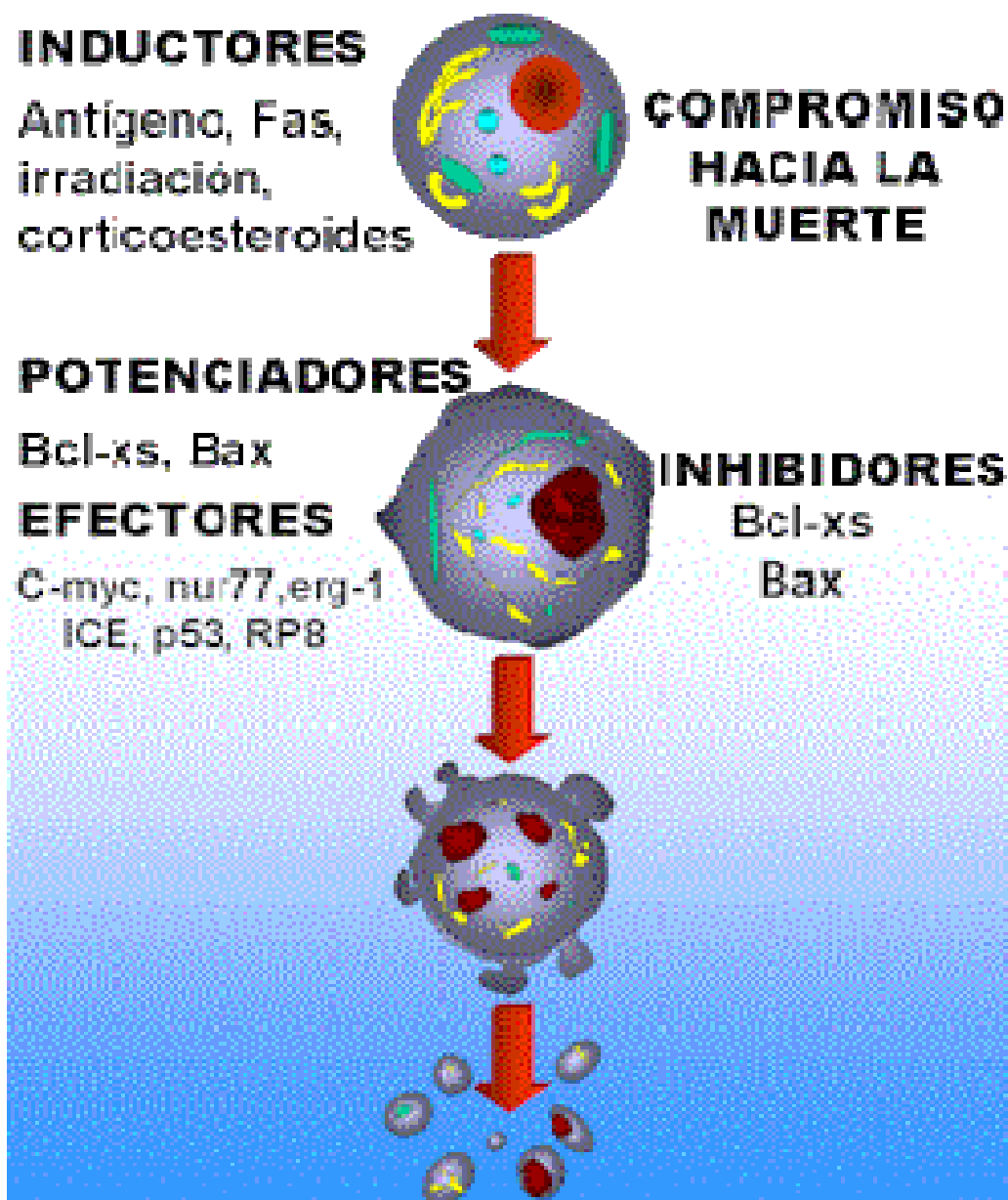


Figura 2. Exelinfo. Imágenes, 2002.

Las células latentes son sensibles a otros inductores del suicidio: rayos X y otros agentes que dañan el ADN. Las lesiones inducidas provocan que las células sintetizen p53, proteína que activa el suicidio (Cohen y Duke, 1992; Duke, 1997).

Se conocen dos formas de inducir la apoptosis de las células innecesarias: uno es la pérdida de factores de supervivencia en este caso la desaparición de la interleucina 2, el segundo mecanismo depende de una proteína denominada Fas. Los linfocitos T activos producen pequeñas cantidades de Fas que se sitúa en la membrana celular. Uno de los extremos se proyecta hacia el exterior de la célula y

el otro hacia adentro. El ligando de Fas presente en las células activadas se une al Fas que hay en la misma célula o en otro linfocito activado, en el sitio donde se ha desencadenado la infección. Esa unión es la señal para que las células portadoras de Fas sufran apoptosis. La sensibilidad que tienen algunos tipos celulares para no sufrir apoptosis esta siendo modulada fundamentalmente por la proteína Bcl-2 (inhibidor de apoptosis) y otras similares, como la Bax y Bad (Fisher, 1995; Strand, 1996, Van Parijs y Abbas, 1996). (Figura 3)

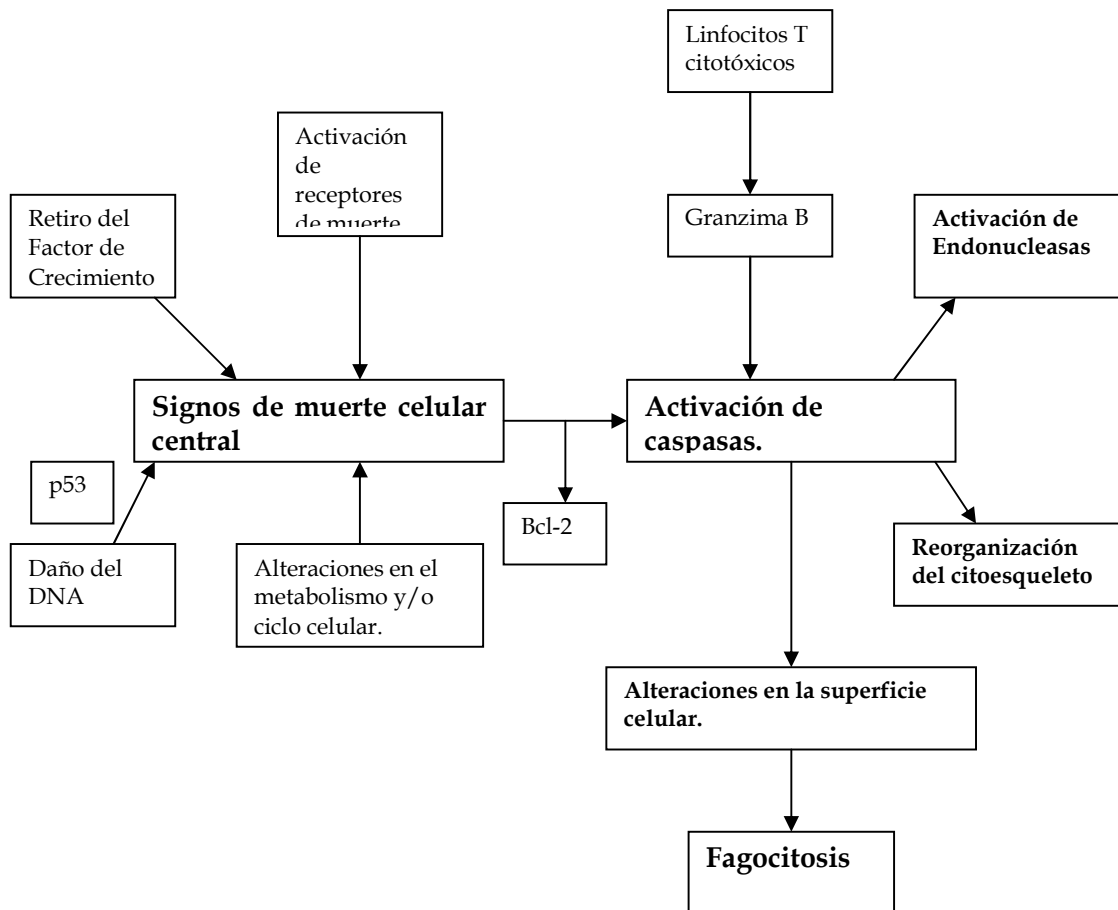


Figura 3. Representación esquemática de las fallas centrales de la muerte celular programada. (Lippincott , 1998)

Hay ciertas enfermedades asociadas a aumento o disminución de muerte celular programada por ejemplo: (Cuadro I y II)

Cuadro I Enfermedades asociadas a inhibición de apoptosis.

ENFERMEDADES ASOCIADAS A INHIBICIÓN DE APOPTOSIS

(aumento de la proliferación)

1. CANCER.
 - ❖ Linfoma no Hodgkin folicular (bcl-2+)
 - ❖ Carcinoma (p53+)
 - ❖ Tumores hormona-dependientes: Carcinoma de glándula mamaria, Carcinoma prostático y Carcinoma de ovario.
2. ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS
 - ❖ Lupus Eritematoso sistémico.
 - ❖ Glomerulonefritis autoinmunitaria.
3. INFECCIONES VIRALES
 - ❖ Herpesvirus.
 - ❖ Poxvirus.
 - ❖ Adenovirus (EIB)

Chuaqui y Gonzalez, 1999.

Cuadro II Enfermedades asociadas a aumento de apoptosis.

**ENFERMEDADES ASOCIADAS A AUMENTO DE APOPTOSIS.
(disminución de proliferación = aumento de muerte celular)**

1. SIDA.
2. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
 - ❖ Enfermedad de Alzheimer.
 - ❖ Enfermedad de Parkinson.
 - ❖ Esclerosis lateral amiotrófica.
 - ❖ Retinitis pigmentosa.
 - ❖ Degeneración cerebelosa.
3. SINDROMES MIELODISPLÁSICOS.
 - ❖ Anemia aplásica.
4. DAÑO ISQUÉMICO.
 - ❖ Infarto al miocardio.
 - ❖ Apoplejía.
 - ❖ Daño por perfusión.
5. DAÑO HEPÁTICO.

Chuaqui y Gonzalez, 1999.

Diferencias entre necrosis y apoptosis.

La muerte por apoptosis se caracteriza por no liberar material celular al espacio intersticial, lo que evita el proceso inflamatorio; también en este tipo de muerte celular los organelos prácticamente permanecen integros; sin embargo, pueden tener alteraciones (Flores- Pérez, 2002).

Cuadro III. Diferencias entre necrosis y apoptosis.

| NECROSIS | APOPTOSIS |
|---|---|
| No tienen un programa regulado por genes | Esta controlada por un programa regulado por genes. |
| Incremento en el volumen celular. | Reducción en el volumen nuclear. |
| Fragmentación del ADN nuclear variable. | Fragmentación del ADN nuclear en longitudes de 200 pares de bases (pb) y sus múltiplos (apariencia de escalera o internucleosomal). |
| Los organelos aumentan de volumen. | Los organelos no sufren cambios en su tamaño. |
| Liberan citoplasma al espacio intersticial generando inflamación. | El citoplasma se conserva en cuerpos apoptóticos, no provoca inflamación. |
| Activación de proteasas inespecíficas, asociadas con lisosomas. | Activación de proteasas (caspasas) específicas. |
| No depende de energía (ATP) | Depende de energía (ATP) |

Flores-Pérez, 2002.

Receptores de membrana celular que median la apoptosis.

Fas o Apo-1, nombre de diferenciación (CD95), y es una proteína transmembrana tipo II glicosilada de aproximadamente 43kD que se expresa constitutivamente en gran variedad de tejidos normales y líneas tumorales (Tucek-Scabo *et al*, 1996).

El Fas/Apo1 es miembro de la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF), entre los que se encuentran los receptores TNF tipo I y II, el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), CD40 y CD27 (Itoh *et al*, 1991; Oehm *et al*, 1992).

El ligando del Fas/Apo-1 es una proteína de membrana tipo III de 40kD miembro de la familia del TNF que está altamente expresado en linfocitos activados (Suda *et al*, 1993). La unión del Ag de membrana Fas/Apo-1 con su ligando y con anticuerpos antagonistas, es una de las vías de inicio de señales para la apoptosis (Cascino *et al*, 1994). Existe una relación estrecha entre la participación del ligando Fas y la citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8+, mecanismo efector de gran importancia en la respuesta inmune antitumoral (Kagi *et al*, 1994).

El Fas y el FasL participan en la muerte de linfocito T activados al final de una respuesta inmune, en la muerte de células infectadas o cancerosas por los linfocitos Tc y NK, en la muerte de células del sistema inmune que participan en una inflamación en sitios inmunoprivilegiados, como el ojo, el testículo o el

páncreas y la muerte de los hepatocitos en la hepatitis B fulminante (Roseto y Brenner, 1999).

Genes Bcl-2 y Bcl-X en la regulación de la apoptosis.

El Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 gen) fue el primer proto-oncogen detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B. Este gen facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras aberraciones genéticas que pueden conducir a la aberración maligna (Binder *et al*, 1995; Oltvai *et al*, 1993). La expresión de este gene en algunos tipos de cáncer es marcador de mal pronóstico (Osborne y Schwartz, 1994, Binder *et al*, 1995).

Los miembros de la familia Bcl-2 están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-Xs, Mcl-1; actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Boise *et al*, 1993; Boise *et al*, 1995).

El gene Bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis inducida por glucocorticoides, irradiación con rayos X y, deprivación de factores de crecimiento o la muerte asociada a procesos de diferenciación celular (Boise *et al*, 1993; Boise *et al*, 1995).

En los adultos, Bcl-2 se expresa en múltiples órganos, tales como el sistema nervioso (especialmente en neuronas y ganglios sensoriales), linfocitos activados y células plasmáticas, en ganglios linfáticos, células precursoras, en médula ósea, tejidos reproductores y una gran variedad de células epiteliales (Cory, 1995).

El Bcl-2 se expresa de manera importante durante estadios muy tempranos de la diferenciación de células B y T, también está altamente expresado en la etapa de diferenciación final de los linfocitos; es por ello que las células en estadios intermedios de desarrollo son más susceptibles a la muerte celular (Cory, 1995).

Se ha observado que esta proteína inhibe la actividad de proteasas de la familia ICE/ced-3, que constituyen uno de los elementos más distales en la vía inductora de la apoptosis (López-Hoyos, 1998).

Otros genes que están involucrados en el proceso de apoptosis.

Los genes c-myc y nur-77, están asociados con la inducción de apoptosis en algunas células y el gen p53, cuyo requerimiento se produce en casos de daño genómico (Osborne y Schwartz, 1994).

El gene p53 es el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Este bloqueo lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que produzca la reparación del DNA antes de que se replique (Cohen, 1993; Meyn *et al*, 1996). Este gene mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el DNA ha sido sustancial (Tanaka *et al*, 1996). En diversos tipos celulares incluyendo los linfocitos, la sobreexpresión de p53 conduce directamente a la apoptosis (Cory, 1995).

El gene nur77 se requiere para la apoptosis mediada por el receptor de células T (TCR), no siendo importante en la muerte celular por glucocorticoides o radiación ionizante (Cory, 1995).

El producto de nur77 es una proteína que pertenece a la familia del receptor nuclear de hormonas esteroideas y su efecto en la apoptosis está dado porque actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la muerte celular (Núñez *et al*, 1994).

La proteína Myc, que es producto del proto-oncogen c-myc. La sobreexpresión del gen c-myc pudiera resultar en mitosis o apoptosis en dependencia de la disponibilidad de otros factores que estimulan el crecimiento celular (Cohen, 1993). De esta forma la expresión incrementada de Bcl-2 en presencia de un aumento de c-myc provoca una inhibición de la apoptosis mediada por c-myc, lo que explica la cooperación que se produce entre ambos genes en el origen de las neoplasias (Cory, 1995).

Mecanismos bioquímicos de la apoptosis.

La fragmentación del DNA ha sido observada a partir de la activación de una endonucleasa endógena nuclear dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta enzima selecciona sitios rotos de DNA localizados entre las unidades nucleosomales generando fragmentos de DNA mono y oligonucleosomales. Estas fibras de DNA rotas pueden ser identificadas con un marcador libre de 3'-OH terminal con nucleótidos modificados en una reacción enzimática. La deoxinucleotidil transferasa terminal se utiliza como un marcador de fibras de DNA mediante una polimerización catalítica de los nucleótidos con 3'-OH terminal (Boehringer, 1998). (Figura 4)

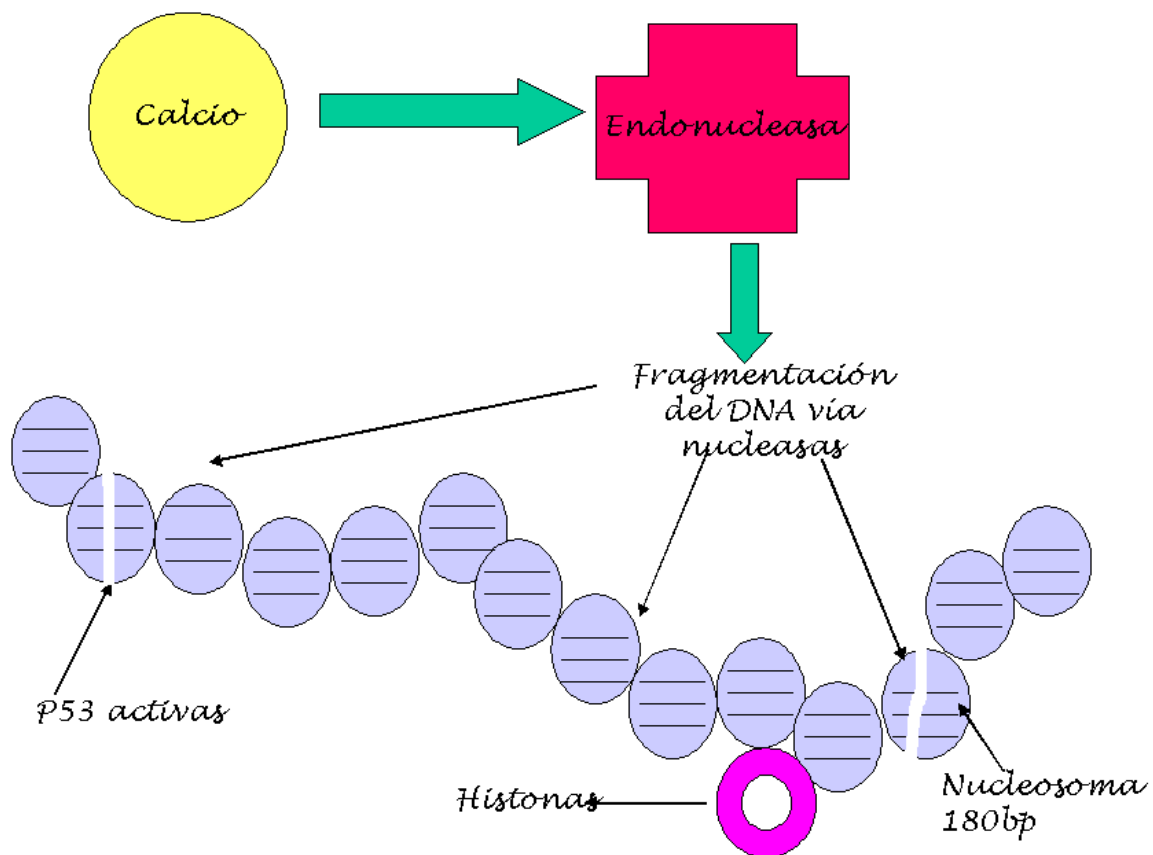


Figura 4. Aspectos bioquímicos de la apoptosis.

Por otra parte en una célula saludable, las caspasas permanecerán como proenzimas o zimógenos, y deben ser activadas mediante la degradación de determinados sitios ricos en aspartato propios de la proteína, liberando así dos fragmentos de un peso molecular aproximadamente entre 10 y 20kDa, los cuales posteriormente serán ensamblados en el tetrámero, que formará en complejo enzimático activo.

Este mecanismo de activación de caspasas puede darse de dos formas: La autoactivación que se denomina, autocatálisis, o la activación indirecta por otras caspasas ya activas.

Papel de la apoptosis en el sistema inmunitario.

El 95% de los timocitos son destruidos en el timo por mecanismos de apoptosis, proceso denominado selección negativa (delección clonal), el cual elimina la existencia de clones T autorreactivos (Jondal *et al*, 1995, Dávila, 2002).

En médula ósea existe un proceso similar de delección de clones B autorreactivos en el estadio B inmaduro por entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie en ausencia de señales coestimuladoras (Schwartz, 1993). Los linfocitos T maduros pueden sufrir apoptosis, lo que corrobora su inmunorregulación. Entre los factores que pueden inducir apoptosis de células maduras están: los glucocorticoides y las radiaciones gamma, la estimulación del complejo TCR/CD3 por anticuerpos monoclonales, Ags nominales y superantígenos y la estimulación de los receptores CD2, Fas/Apo-1 y TNF (Osborne y Schwartz, 1994, Cohen y Duke, 1992).

El mecanismo de apoptosis y su relación con las mitocondrias.

Una gran variedad de eventos claves en apoptosis están focalizadas en las mitocondrias. Estos incluyen: La liberación de activadores de caspasas (por ejemplo: Citocromo C), cambios en el transporte de electrones, pérdida potencial mitocondrial transmembranal, alteraciones en el proceso de Oxido-Reducción celular, participación de la familia de las proteínas pro y antiapoptóticas Bcl2 (Villaroel y Couve, 1999; Oltvai *et al*,1993). (Cuadro IV).

Cuadro IV. Proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas.

| Proteínas antiapoptóticas | Proteínas proapoptóticas |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Bcl-2 | Bax |
| Bcl-xL | Bak |
| Bcl-w | Bcl-x8 |
| Mcl-1 | |
| NR-13 | |
| A-1 | |

Lippincott, 1998.

Los efectores de la apoptosis están representados por enzimas intracelulares (proteasas) denominadas caspasas. Las caspasas llevan a la apoptosis haciendo la proteólisis sobre un número discreto de proteínas. Además:

- a) Destruyen los inhibidores naturales, como el inhibidor de la ADNnucleasa llamada CAD/Icad permitiendo a esta nucleasa fragmentar el ADN.
- b) Desregulan los dominios regulatorios y catalíticos de las enzimas esenciales en la regulación del citoesqueleto celular, como la gelsolina, la FAK (por focal adhesión kinase) y la PAK2 (por p21-activated kinase 2).

De esta manera sistemática estas enzimas hacen que la célula corte sus contactos moleculares con sus vecinas, reorganizando el citoesqueleto, suprimiendo la replicación del ADN y su reparación, fragmentando el ADN, destruyendo la estructura nuclear y finalmente induciendo cambios en la

membrana celular que presenta moléculas (la fosfatidil serina, la anexina, un receptor de la trombospodina y ciertas glicoproteínas) que atraen a los macrófagos y de esta manera los cuerpos apoptóticos son fagocitados (Roseto y Brenner, 1999).

Las proteínas antiapoptóticas tales como la Bcl-2, Bcl-xL y la oncogénica Abl pueden mantener la supervivencia y la clonogenicidad en la fase de estos tratamientos. (Villaroel y Couve, 1999)

Algunas proteínas pro apoptóticas tales como Bax, una proteína de muerte celular de mamíferos que tiene como blanco la membrana mitocondrial, puede inducir su daño y las células mueren aún cuando las caspasas sean desactivadas.

Mecanismos que utilizan las mitocondrias para disparar la muerte celular programada.

❖ Interrupción del transporte de electrones en la fosforilación oxidativa y en la producción de ATP.

La irradiación induce apoptosis en timocitos y una interrupción del transporte de electrones, probablemente en el paso de citocromo b-c1/citocromo c (cito c). La ceramida (un segundo mensajero implicado en el señalamiento apoptótico) interrumpe el transporte electrónico en el mismo paso tanto en células como en mitocondrias aisladas. La unión a Fas también conduce a la interrupción de la función de citocromo c en el transporte de electrones.

❖ Liberación de proteínas que disparan la activación de proteasas de la familia de las caspasas.

Durante la apoptosis el citocromo c es liberado por las mitocondrias y es inhibido por la presencia de Bcl-2 en estos organelos. El resultado es la activación de caspasa 9 la que es luego procesada y activa otras caspasas para orquestar la ejecución bioquímica de las células (Villaroel, L y Couve, 1999).

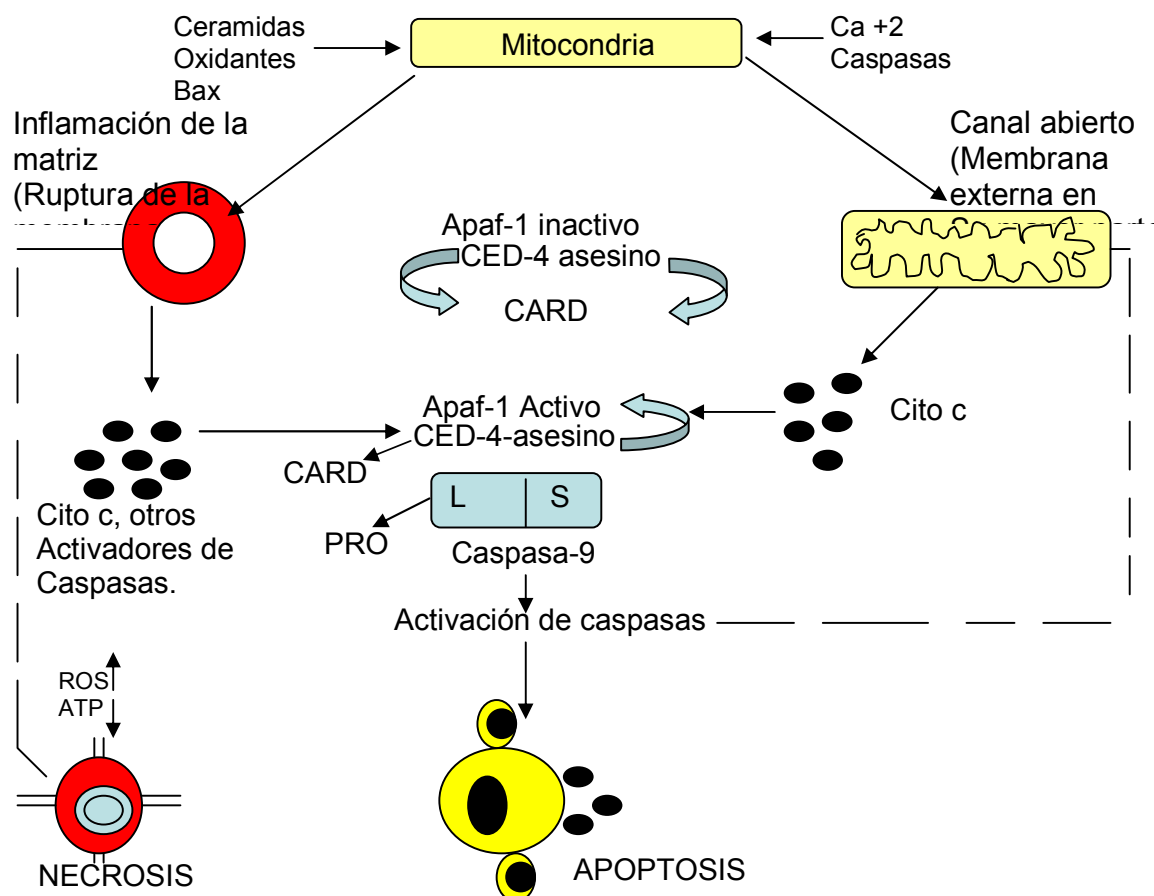
Una vez que el citocromo c es liberado, este predispone a la célula a morir tanto por un mecanismo apoptótico rápido, que involucra la activación de caspasas por el gene Apaf-1, o un proceso necrótico más lento debido al colapso del transporte de electrones, que ocurre cuando el citocromo c es producido nuevamente por las mitocondrias, resultando en una variedad de secuelas deletéreas incluídas en la generación de radicales oxígeno libre y una disminución de la producción de ATP (Villaroel, L y Couve, 1999).

❖ Alteración del potencial de oxidación-reducción celular (redox).

Todo factor que disminuya la eficiencia en el acoplamiento de la cadena de transporte de electrones, incrementa la producción de superóxidos. Tanto los superóxidos como la peroxidación de lípidos se ven notablemente incrementados durante la apoptosis inducida por una gran cantidad de estímulos. Sin embargo, la generación de ROSs (especies de oxígeno reactivo) constituirá un evento relativamente tardío que ocurre cuándo las células se han embarcado en un proceso de activación de caspasas. En este sentido, los intentos por estudiar la apoptosis bajo condiciones de anoxia han demostrado que algunos estímulos proapoptóticos, funcionan en ausencia de oxígeno. Esto demuestra que los ROSs no son condición propia de la apoptosis (Villaroel, L y Couve, 1999).

Sin embargo, los ROSs pueden ser generados bajo condiciones de virtual anaerobiosis, por lo que su rol en apoptosis no puede ser excluida (Villaroel, L y Couve, 1999). (Figura 5).

Especies de oxígeno reactivo y su rol en apoptosis (Figura 1).



(Villaroel y Couve, 1999).

Apoptosis y virus.

Cuando un virus invade una célula busca que su nuevo huésped produzca únicamente las proteínas que son vitales para producir más virus.

Esto llevaría a la muerte de la célula y por lo tanto a su propia destrucción. Y por esto algunos virus han evolucionado para inhibir la muerte celular programada de las células infectadas. Algunos virus producen proteínas similares al inhibidor de la apoptosis Bcl-2 o degradan proteínas responsables de la apoptosis como p53 y las proteasas parecidas a ICE. El huésped para defenderse de esta invasión por los virus produce los linfocitos T citotóxicos que destruyen las células infectadas mediante la activación de enzimas que llevan a la necrosis celular (Jiménez, 2002). La muerte de los linfocitos lleva a que las células citotóxicas también disminuyan ya que requieren de una señal enviada por los linfocitos T cooperadores para evitar su suicidio. Sin embargo, los linfocitos T cooperadores de los pacientes con SIDA presentan grandes cantidades de Fas antes de ser activadas (las células producen normalmente cierta cantidad de Fas) y podrían morir prematuramente antes de cumplir su función (Jiménez, 2002).

Por otra parte, algunos virus inducen la muerte celular programada mediante la acción directa de una proteína: Adenovirus, Alfavirus y Circovirus (Murphy *et al*, 1993).

El Herpesvirus humano tipo 8 gracias a que presenta un factor regulador de interferón (IRF), una interleucina (IL6) y la proteína Bcl-2 homóloga, puede inhibir la inducción de apoptosis de la célula hospedera (Lennette, 1999).

Los virus de Estomatitis Vesicular (VSV) e Influenza (Inf), son inductores de apoptosis a través de señales no conocidas totalmente. En particular el virus de Influenza es totalmente citotóxico en células MDCK y humanas; mientras que el virus VSV induce apoptosis acción citopática en células Vero y Hela. (Riva *et al*; 2001).

In- vitro se ha demostrado que el virus de Maedi-Visna induce muerte celular en células del plexo coroideo de la oveja, por un mecanismo que está fuertemente asociado a caspasas activas (Duval *et al*; 2002), como se mencionó anteriormente uno de los mecanismos por los cuales la célula puede llevar a cabo su muerte es por medio de la liberación de la cascada de caspasas. Los virus que causan un aumento en apoptosis son: VIH y Adenovirus. (Roseto y Brenner; 1999).

OBJETIVO GENERAL.

- Demostrar que el virus de Artritis Encefalitis Caprina causa muerte celular programada (apoptosis) en glándulas anexas (ámpula, glándula bulbouretral y vesícula seminal) del aparato reproductor de machos caprinos infectados.

OBJETIVO PARTICULAR.

- Demostrar que existe diferencia entre los animales infectados naturalmente, inoculados con la cepa de referencia ATCC y los inoculados con la cepa FESC.

JUSTIFICACIÓN.

- Demostrar que el virus de Artritis Encefalitis Caprina se encuentra en el aparato reproductor de machos caprinos y con ello se fortalece la teoría de que la vía venérea puede ser una forma de transmisión de la enfermedad.

HIPÓTESIS.

Si se infectan grupos de animales con diferentes cepas de Virus de Artritis Encefalitis Caprina entonces se encontrará un aumento de la muerte celular programada (apoptosis) presente de manera normal en las glándulas anexas (ámpula, glándula bulbouretral y vesícula seminal) del aparato reproductor de machos caprinos. Además de encontrar diferencias entre cada uno de los órganos estudiados y entre cada grupo de animales.

El presente trabajo es parte de un proyecto denominado "Efecto del Virus de Artritis Encefalitis Caprina en el aparato reproductor de Machos Caprinos" subsidiado por el CONACYT con número de clave 34964-B.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Los cortes de tejidos (ámpula, vesícula seminal y glándula bulbouretral) incluidos en parafina se obtuvieron de animales pertenecientes a cuatro grupos:

- a) Animales naturalmente infectados (n=5) Grupo I.
- b) Animales inoculados con la cepa de referencia ATCC (n=3) Grupo II.
- c) Animales inoculados con la cepa FESC (n=3) Grupo III.
- d) Animales negativos al virus (n=3) Grupo IV.

2. MATERIAL NO BIOLÓGICO.

- Kit para llevar a cabo la identificación de la muerte celular programada (In Situ Death Detection kit.AP). Esta técnica tiene como principio: Marcar todas aquellas células que presenten ruptura de su DNA mediante la activación de una endonucleasa endógena dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Esta enzima selecciona sitios rotos de DNA localizados entre las unidades nucleosomales. Estas fibras de DNA rotas pueden ser identificadas con un marcador libre de 3'-OH terminal con nucleótidos modificados en una reacción enzimática (Marcado con Fluoresceína) (Boeringher, 2001, No. de Catálogo 11684809001; No de Lote 901612220).
- Solución amortiguadora pH 7.3-7.4 Solución de Fosfatos Buferada (PBS). Anexo I.
- Triton X-100. (0.1%) (No. de Catálogo 34X100).
- Etanol (96°, 90°, 80° y 70°).
- Agua destilada.
- DNAasa (1ml de PBS + 0.1mg de Cloruro de Magnesio).
- Microscopio de Fluorescencia y Contraste de fases.
- Xileno.
- Citrato de Sodio (0.1%).

3. DESARROLLO DE LA PRUEBA.

- a) Se realizaron cortes de 5mm de grosor a partir de las muestras incluidas en parafina
- b) Desparafinado: Los cortes en parafina se introdujeron en xileno por 12 horas.
- c) Rehidratación: Dichos cortes se introdujeron en etanol a diferentes concentraciones (96°, 90°, 80° y 70°). Por 5 minutos en cada concentración. Al terminar se introdujeron las laminillas en agua destilada.
- d) Lavados: Se procedió a realizar dos lavados con la solución amortiguadora (PBS) pH 7.3-7.4
- e) Se añadió la solución detergente (Triton X-100 0.1% + Citrato de Sodio 0.1% en PBS pH 7.3-7.4). Se dejó en cámara húmeda a temperatura ambiente por ocho minutos.

- f) Lavados: Se procedió a realizar dos lavados con la solución amortiguadora (PBS) pH 7.3-7.4
- g) Se agregó el conjugado (deoxirribonucleotidil transferasa +base (uracilo) + fluoresceína). Se puso a cada corte 25ul del conjugado y un cubreobjetos, este con el fin de conservar la humedad. Se incubó por una hora a 37°C en cámara húmeda.
- h) Lavados: Se procedió a realizar dos lavados con la solución amortiguadora (PBS) pH 7.3-7.4 de manera enérgica.
- i) Se procedió a cubrir las laminillas con cubreobjetos.
- j) Se procedió a observar las laminillas en el microscopio de fluorescencia y contraste de fases.
- k) Se examinó un corte de cada tejido de cada animal de los cuatro grupos estudiados. Para establecer el porcentaje de apoptosis en cada corte se observo un total de 200 células por campo.

*Al control positivo se le agregó una DNAasa (100ul) y se incubó por 20 minutos a 37°C.

*Al control negativo no se agregó el conjugado, se dejó incubando en cámara húmeda con PBS por el mismo tiempo que las otras laminillas.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un análisis estadístico bilateral de varianza o Prueba de Friedman la cuál equivale al análisis de varianza con dos vías de clasificación usada frecuentemente en modelos de bloques al azar que permite remover los efectos de los bloques de un experimento. Los resultados son expresados como “Chi cuadrada de Friedman” por lo que esta orden no sólo calcula el valor sino que también ofrece los grados de libertad y el nivel de significancia; con lo cuál puede aceptarse o rechazarse la hipótesis nula (López; 1994).

DIAGRAMA DE FLUJO

GRUPO DE ANIMALES

GRUPO I (N=5)

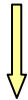
GRUPO II (N=3).

GRUPO (N=3).

GRUPO (N=3).



OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL APARATO REPRODUCTOR DE LOS MACHOS (Ámpula, vesícula seminal y glándula bulbouretral)
FIJACIÓN DE ÓRGANOS EN SOLUCIÓN DE BOUIN.



CORTES EN PARAFINA (5 micras).
DESPARAFINADO
XILOL 12HORAS.
REHIDRATACIÓN.
ALCOHOL 96°,90°,80° Y 70° 5min. c/u.
AGUA DESTILADA (3-5 minutos máximo 4 horas).
SE LAVÓ CON PBS pH 7.3-7.4 (2 lavados).

SE AÑADIÓ EL DETERGENTE (0.1%TRITON X-100 + 0.1% DE Citrato de Sodio en PBS pH 7.3-7.4).
SE INCUBÓ EN CÁMARA HÚMEDA A TEMPERATURA AMBIENTE POR 8 MINUTOS.



SE LAVÓ CON PBS pH 7.3-7.4 (2 lavados).
*Control positivo: agregar una DNAasa (1ml de PBS + 0.1mg cloruro de Magnesio) 100microlitros por 20minutos a 37°C.
SE AGREGÓ EL CONJUGADO BOTE 1 (enzima +fluoresceína) BOTE 2(base) (1:10), poner a cada corte un cubreobjetos para conservar la humedad y expandir el conjugado a la muestra.
*Al control negativo no se le agregó el conjugado.
SE INCUBÓ POR UNA HORA EN CÁMARA HUMEDA A 37°C.
SE LAVÓ CON PBS pH 7.3-7.4 (de manera enérgica)



SE OBSERVÓ AL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA Y CONTRASTE DE FASES.

RESULTADOS.

La prueba se realizó a 42 cortes (14 animales por 3 cortes) en parafina obtenidos a partir de tejido procedente del aparato reproductor de machos caprinos (Ámpula, Vesícula seminal y Glándula Bulbouretral).

A cada corte también se le realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina, con el fin de comprobar la existencia de algún tipo de daño celular en el tejido, encontrándose que los animales infectados con el virus no presentan en el tejido del aparato reproductor ningún cambio patológico aparente.

De cada grupo de animales se tomaron como base 3-4 cortes, realizando el conteo a cada uno de ellos de la siguiente manera:

GRUPO DE ANIMALES INFECTADOS NATURALMENTE

- * Ámpula : 46 células apoptóticas (Figuras Ia y Ib)
- * Ámpula: 23 células apoptóticas (Figuras IVa y IVb)
- * Glándula Bulbouretral: 11 células apoptóticas (Figuras Ic y Id)
- * Vesícula Seminal: 28 células apoptóticas (Figuras IIIa y IIIb)

GRUPO DE ANIMALES INOCULADOS CON LA CEPA FESC.

- * Ámpula: 11 células apoptóticas (Figuras IIa y IIb)
- * Glándula Bulbouretral: 29 células apoptóticas.(Figura Ia y Ib)
- * Vesícula Seminal: 65 células apoptóticas (Figuras Ic y Id)
- * Vesícula Seminal: 66 células apoptóticas (Figuras IIc y IId)

GRUPO DE ANIMALES INOCULADOS CON LA CEPA ATCC.

- * Ámpula: 15 células apoptóticas (Figuras IIa y IIb)
- * Vesícula Seminal: 124 células apoptóticas (Figuras Ia y Ib)
- * Vesícula Seminal: 56 células apoptóticas (Figuras IIc y IId)

GRUPO DE ANIMALES NEGATIVOS AL VIRUS DE AEC.

- * Ámpula: 26 células apoptóticas (Figuras IIc y IId)
- * Glándula Bulbouretral: 44 células apoptóticas (Figuras Ia y Ib)
- * Glándula Bulbouretral: 2 células apoptóticas (Figuras IIa y IIb)

Se tomó el Bazo como control negativo (Figuras Ia y Ib) y el pulmón como control positivo (Figuras IIa y IIb)

Con estos resultados se procedió a realizar el análisis estadístico de la siguiente manera:

Número de células apoptóticas (%) ¹

| GRUPO | ANIMAL | G. BULBOURETRAL | VESICULA SEMINAL | ÁMPULA |
|--------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | 1 | 11(5.5) | 28(14) | 4(2) |
| | 2 | 5(2.5) | 16(8) | 23(11.5) |
| | 3 | 15(7.5) | 9(4.5) | 3(1.5) |
| | 4 | 24(12) | 30(15) | 44(22) |
| | 5 | 11(5.5) | 7(3.5) | 2(1) |
| 2 | 1 | 29(14.5) | 18(9) | 5(2.5) |
| | 2 | 13(6.5) | 65(32.5) | 11(5.5) |
| | 3 | 15(7.5) | 66(33) | 11(5.5) |
| 3 | 1 | 13(6.5) | 65(32.5) | 11(5.5) |
| | 2 | 25(12.5) | 124(62) | 22(11) |
| | 3 | 14(7) | 56(28) | 15(7.5) |
| 4 | 1 | 46(23) | 29(14.5) | 8(4) |
| | 2 | 2(1) | 1(0.5) | 1(0.5) |
| | 3 | 5(2.5) | 16(8) | 26(13) |

1) Tomando en cuenta que 200 células equivalen al 100%

Con estos resultados se realizó la fórmula siguiente:

$$X^2_r = \frac{12}{nk(k+1)} E (R_j)^2 - 3n (k+ 1)$$

n = Número de renglones.

K = Número de columnas.

Ho= No existe diferencia significativa entre órganos.

Ha= Si existe diferencia significativa entre órganos.

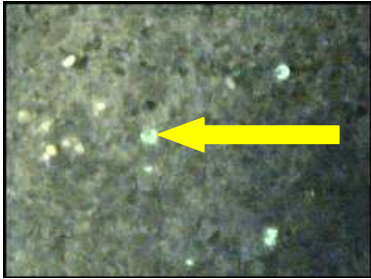
Grados de libertad = 2

Nivel de significancia = 0.05 ó 5.000%

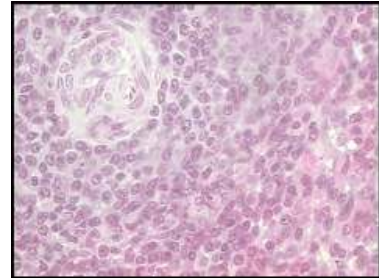
Los resultados obtenidos nos señalan que no existe ninguna diferencia significativa entre órganos y tampoco entre grupos, esto se expresa de la siguiente manera $p > 0.05$ ó 5.000%.

A continuación se presentan las mejores fotografías donde se pueden observar las células apoptóticas y una comparación con la técnica de HE, en dónde se puede observar que no existe daño celular aparente en los tejidos.

CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO

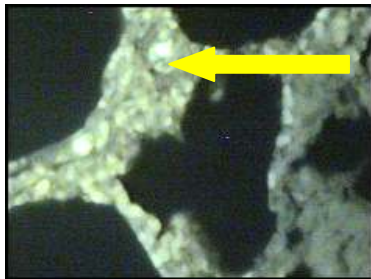


I a

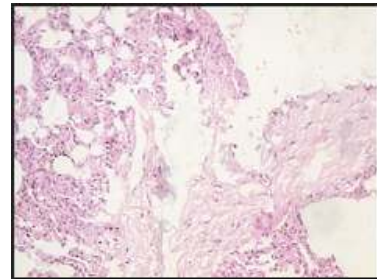


I b

Bazo Control Negativo



II a



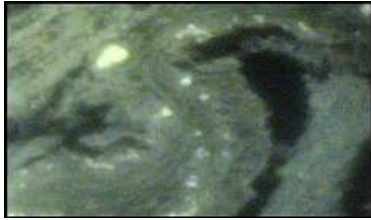
II b

Pulmón Control Positivo

Control negativo
Ia Bazo Túnel
Ib Bazo HE.

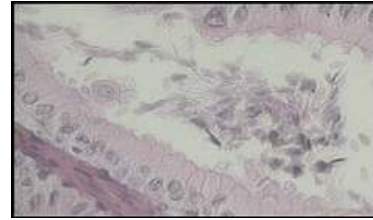
Control positivo
IIa Pulmón Túnel
IIb Pulmón HE.

Animales Infectados Naturalmente Túnel y H.E.

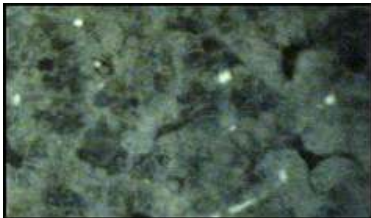


Animal I a

Ampula

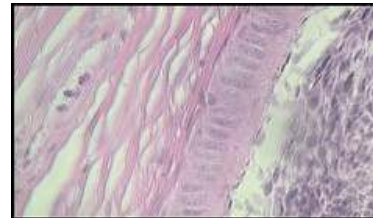


Animal I b

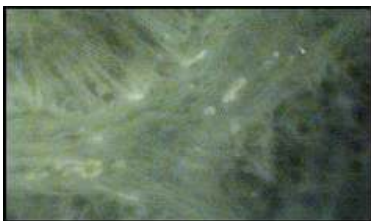


Animal I c

Glándula Bulbouretral

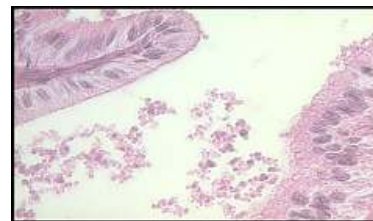


Animal I d

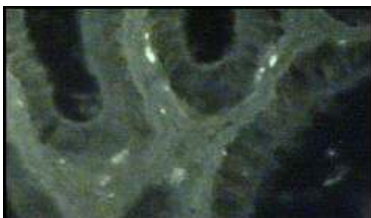


Animal III a

Vesícula Seminal



Animal III b



Animal IV a

Ampula



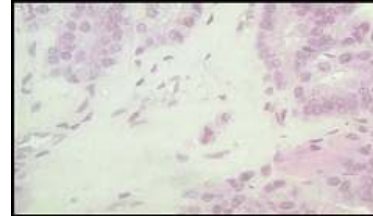
Animal IV b

Animales Inoculados con la cepa FESC Túnel y H.E.

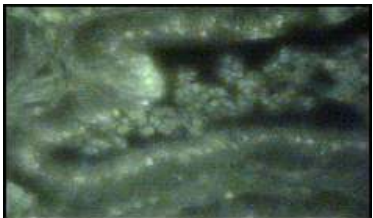


Animal I a

Glándula Bulbouretral

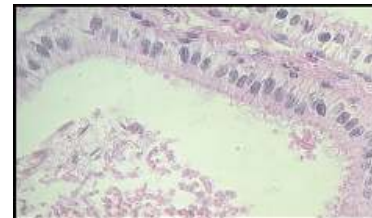


Animal I b

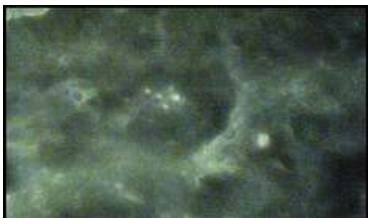


Animal I c

Vesícula Seminal

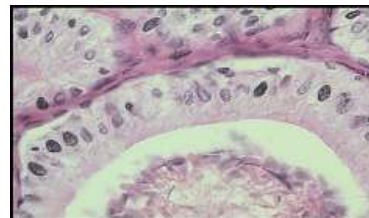


Animal I d

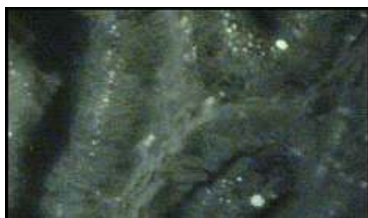


Animal II a

Glándula Bulbouretral

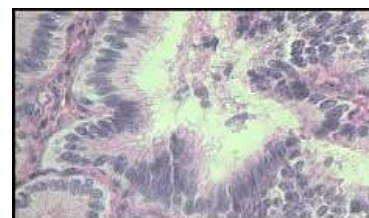


Animal II b



Animal II c

Vesícula Seminal



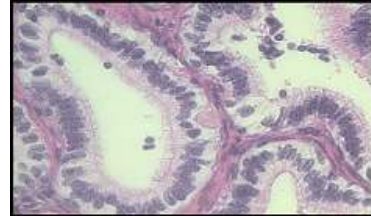
Animal II d

Animales inoculados con la cepa ATCC Túnel y H.E.

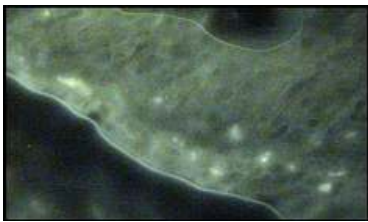


Animal I a

Vesícula Seminal

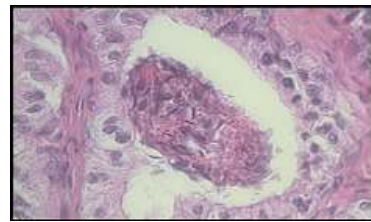


Animal I b

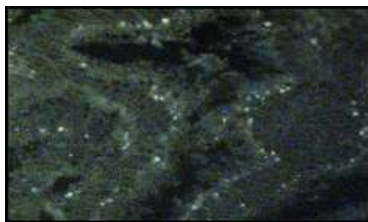


Animal II a

Ampula

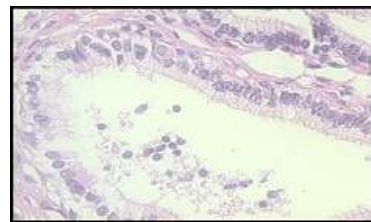


Animal II b



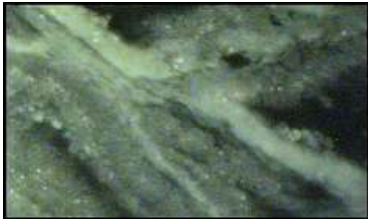
Animal II c

Vesícula Seminal



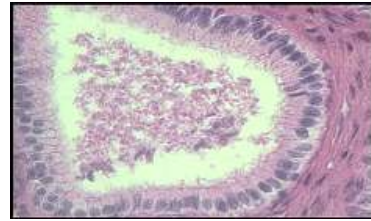
Animal II d

Animales negativos al virus de AEC Túnel y H.E.

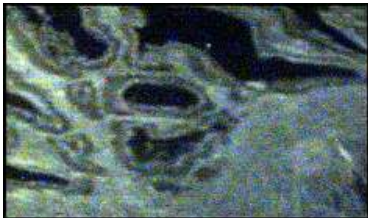


Animal I a

Glándula Bulbouretral



Animal I b



Animal II a

Glándula Bulbouretral

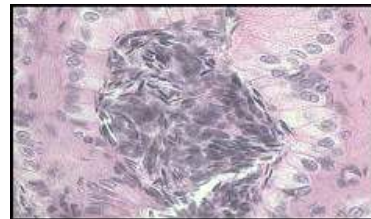


Animal II b



Animal II c

Ampula



Animal II d

DISCUSIÓN

El estudio de la apoptosis busca entender las bases bioquímicas, cambios morfológicos con el fin de determinar los mecanismos que definen su iniciación y regulación. A partir de este entendimiento, podremos conocer la biología molecular de las enfermedades y crear nuevas alternativas terapéuticas en áreas tan diversas como el cáncer, trasplantes, enfermedades autoinmunes y procesos inflamatorios sistémicos (Sydney *et al*, 2002).

Por otro lado al analizar los resultados obtenidos en este estudio se observó que no existe ninguna diferencia entre órganos, ni tampoco entre grupos. Por lo que se puede demostrar que el virus de Artritis Encefalitis Caprina no causa o acelera los procesos de muerte celular programada.

Se han publicado trabajos dónde se menciona que el virus de Artritis Encefalitis Caprina de manera *in vitro* esta asociado con la inducción de apoptosis en células de pulmón y membrana sinovial (Raya, 1997, Gendelman, 1997). Sin embargo, no existen reportes del efecto del VAEC en aparato reproductor de machos caprinos, por lo que puede proponerse el hecho de realizar cultivo celular a partir de estos órganos, para de esta manera observar la muerte celular programada normal, y después infectar estos cultivos con el VAEC y observar si se aumento la presencia del proceso apoptótico en dichas células. De esta manera se podría pensar que *in vivo* después de cierto tiempo de infección con el VAEC se presenta el aumento de apoptosis en los órganos reproductores de machos caprinos.

En futuros trabajos se podría estudiar la mucosa de tejidos tales como: epidídimo, testículo, prepucio, escroto y uretra, para comprobar que en efecto de manera natural existe muerte celular programada y analizar como esta actuando el Virus de Artritis Encefalitis Caprina en estos tejidos, es decir si induce o inhibe la apoptosis presente de manera natural en dichos tejidos.

González (2000) menciona que la apoptosis en el tracto reproductor masculino se ve favorecida por la disminución de las hormonas FSH y Testosterona, lo cuál podría influir en los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo estos parámetros no se evaluaron en el presente estudio; por lo que queda la pauta para trabajos posteriores en los cuáles se tomen en cuenta los niveles hormonales, la edad del animal y la época del año en la que se tomen las muestras. Ya que como se sabe las cabras presentan un fotoperíodo, en el cuál varían los niveles hormonales de acuerdo a la época del año (Invierno/Primavera: Bajan; Verano/Otoño: Suben). El presente trabajo se realizó durante invierno y primavera.

En lo que respecta a la prueba de TUNEL tiene la ventaja de que puede observarse en un microscopio óptico común sin sistema de fluorescencia; además se considera como una metodología cuantitativa que se puede aplicar tanto en

suspensiones celulares como en tejidos procesados en parafina. (Flores- Pérez, 2002, Gavrielly, 1992; Gaffney *et al*, 1995).

Sin embargo, este método tiene desventajas, ya que se reducen los índices de apoptosis a la interpretación comparado con la técnica convencional de Hematoxilina-Eosina (Merino, 2001). A pesar de ello, es aceptado internacionalmente como una prueba específica para cuantificar el índice de apoptosis así se ha utilizado para la detección de apoptosis causada por otros lentivirus como por ejemplo, el virus de Maedi-Visna en células del plexo coroideo de ovejas infectadas con dicho virus, (Duval *et al*, 2002), por lo que en el presente trabajo se tomó en cuenta para utilizarla como una herramienta para la detección de apoptosis en glándulas anexas del aparato reproductor de machos.

La confiabilidad de los métodos inmunohistoquímicos para el estudio y la cuantificación de la apoptosis, por la técnica de TUNEL, ha sido un tema muy discutido en la literatura internacional y algunos argumentan que no marcan todas las etapas morfológicas de la apoptosis, dejando la interpretación al especialista con mayor experiencia visual (Kerr, 1992, Dávila, 2002).

Actualmente se realiza la detección Inmunohistoquímica de p53 (proteína inductora de apoptosis), ya que está se expresa como una proteína nuclear, por lo que se puede utilizar como un factor pronóstico para la inducción de apoptosis, como en algunos casos del cáncer vesical (Miyake *et al*, 2001). Para el caso de Artritis Encefalitis Caprina, esta prueba se podría implementar para conocer mejor la patogenía de esta enfermedad.

CONCLUSIÓN.

En el presente trabajo se observó que no existe diferencia significativa entre los grupos de animales inoculados o infectados con el virus de Artritis Encefalitis Caprina y el grupo de animales negativos a dicho virus.

Con ello se descartó la hipótesis de que el virus antes mencionado causa incremento de la muerte celular programada (apoptosis) en el aparato reproductor de machos caprinos, específicamente en glándulas anexas (ámpula, glándula bulbouretral y vesícula seminal).

ANEXO I
SOLUCION BUFFER SALINA FOSFATADA (PBS)

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| SOLUCIÓN A | (1 litro) |
| NaCl | 8g |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.2g |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0.13g |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 2g |
| Agua destilada | 800ml |

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| SOLUCIÓN B | |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.6g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.6g |
| Glucosa | 10g |
| Agua desionizada | 450ml aproximadamente |

| | |
|--------------------|------|
| SOLUCIÓN C | |
| Rojo de fenol (1%) | 16ml |

PROCEDIMIENTO

- 1) Disolver Los constituyentes en el orden enlistado.
- 2) Adicionar la solución B en la solución A.
- 3) Adicionar la solución C en la mezcla del inciso anterior.
- 4) Aforar a 1000ml con agua desionizada.
- 5) Esterilizar por filtración, presión positiva.
- 6) Almacenar en refrigeración a 4°C.

Aida; Marínez; Garrido, 1994

BIBLIOGRAFIA

1. ABBAS, K Abul ; Lichtman, H Andrew ; Pober, S Jordan. Inmunología celular y molecular. Segunda edición. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1995.
2. ADAMS, D. and T. Crawford. A viral AEC syndrome in goats. Int. Goat Res. J. 1980a 1: 168-172
3. ADAMS, D., P. Anderson-Klevjer., P. Carlson., J. McGuire and T. Gorchman. Transmission and control of AEC virus. Am. J. Vet. Res.1983; 44 (9): 1670-1675
4. ADAMS, D., R. Gogolewski., P. Barbet and F. Cheveers. Identification of AEC retrovirus proteins in immunodiffusion precipitins lines. J. Gen. Virol. 1985; 66 (5): 1139-1143
5. ADAMS, D., T. Crawford and A. P. Klevjer. A pathogenic study of the early connective tissue lesions of AEC. Am.J.Path. 1980 b; 99: 257-278
6. ADAMS, D., T. Crawford., K. Banks., T. Mcguive and L. Perryman. Immune response of goats persistently infected with AEC virus. Infect. Immun. 1980 c ; 28: 421-427
7. AIDA, Javier Antonieta ; Martínez Rodríguez Humberto Alejandro ; Garrido Fariña German Isauro. Manual de Laboratorio de Virología Veterinaria. FES-C, UNAM. Nov,1994:91.
8. ALVAREZ, Del Valle J.L. Artritis Encefalitis Caprina (Seroprevalencia en algunos estados de la República). 1984.
9. ARANGO, P.M.C La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. Rev. Cubana Oncología,1997; 13(2):126-134.
10. BINDER C, Marx D, Overhoff R, Binder L, Schauer A, Hiddeman W. Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathogenical variables. Annals of Oncology 1995; 6:1005-10.
11. BOEHRINGER, Mangnheim. Apoptosis and Cell proliferation. Second edition. Germany, 2001.
12. BOISE LH, González-García M, Postema CE. Bcl-x and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell. 1993; 74:597-08.
13. BOISE LH, Gottschalk AR, Quintns J, Thompson CB. Bcl-2 and Bcl-2 related proteins in apoptosis regulation. Curr Top Microbiol Immunol 1995; 200:107-21.
14. BUCHAN, J. Characteristics of orf in a farming community in mid-wales BMJ 1996; 313:203-204
15. CASCINO I, Pappoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G. Fas/Apof-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmatic signalin domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. J. Immunol 1994; 156 (1): 13-17
16. CASTILLO, Castillo Sleygh. Síndrome de Sjogren patogénesis. Instituto de Oncología y Hematología. Colegio de Odontólogos de Venezuela, 2001.

17. CHEEVERS, W.P ; knowles, D.P ; McGuire, T.C ; Cunningham, D.R ; Adams, D.S ; Gorham, J.R. Chronic disease in goats, orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. Lab. Invest. 1988 ; 58 : 510-17.
18. CHUAQUI, Benedicto J ; González B, Sergio. Manual de Patología. Capítulo II. Universidad Católica de Chile. Chile, 1999.
19. CLEMENTS, J., O. Narayan. and L. Cork. Biochemical characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. J. Gen. Virol. 1980; 50:423-427
20. COHEN JJ, Apoptosis. Immunol. Today 1993; 14(3):126-30.
21. COHEN, J. Duke, R. Apoptosis and programmed cell death in immunity. Annual Reviews Immunology , 1992 10:267-293.
22. CORK, L. Differential diagnosis of viral leukoencephalomyelitis of goats. Lab. Invest,1989. 42: 596-602
23. CORK, L., and O. Narayan. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. Lab. Inv. 1980; 42: 596-602
24. CORK, L., W. Hadlow., J. Gorham., R. Piper and T. Crawford. 1974a. Pathology of viral leukoencephalomyelitis of goats. Acta Neuropath. 29: 281-292
25. CORK, L., W. Harlow., T. Crawford., J. Gorham and R. Piper. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. J.Infec. Dis. 1974 ; 129: 134-141
26. CORY S, Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. Ann Rev, Immunol 1995;10(1):7-13
27. CRAWFORD, T., and S. Adams. CAE features and presence of antibody in selected goat population. J. Am. Vet. Med. Ass. 1981; 178:713-719.
28. CRAWFORD, T., S. Adams., R. Sande., J. Gorham and J. Henson. The connective tissue component of the AEC syndrome. Am.J.Path. 1980, 100: 443-450.
29. DANIEL, Wayne W. Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la Salud. Cuarta edición. Limusa Wiley. México D; F. 2002; 701-06.
30. DÁVILA, Cansino José Carlos. Crónica de una muerte celular programada. Universidad de Málaga, Encuentros 58, Ciencias UMA, 2002.
31. DEANE David. Orf Virus Encodes a Novel Secreted Protein Inhibitor of Granulocyte-Macrophage Colony -Stimulating Factor and Interleukin-2. J. Virol .2000 74:1313-1320.
32. DINTER, Z and Morein,B. Virus infection of ruminants. New York : Elsevier Science Publishers ; 1990.
33. DUKE, R. Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad. Investigación y Ciencia. 1997. 44-52.
34. DUNN, P. The Goat keepers veterinary. Book. 2th ed. Farming Preees. London, 1990
35. DUVAL, R ; Bellet, V ; Delebassée, S ; Bosgirand, C. Implicación de caspasas durante la apoptosis inducida por el virus de Maedi-Visna. Journal of General Virology, 2002 b ; 83(Pt12) : 3153-61.

36. DUVAL, R ; Delebassée, S ; Cardot, P.J ; Bosgirand, C. Visna virus- induced apoptosis cytopathic effect in-vitro is caused by apoptosis. Archives of Virology, 2002 a; 147(5) : 943-59.
37. EAST, N., J. Rowe., J. Dahlberg., G.Theilen and N. Pedersen. Modes of trasmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Small Ruminant Res. 1993; 10:251-262.
38. ELLIS, T.M ; Wilcox, G.E ; Robinson, W.F. Comparision of caprine arthritis encephalitis viruses from goats with arthritis and goats with chronic interstitial pneumonia. Australian Veterinary Journal, 1987 ; 65, 8 :254-57.
39. EXELINFO. Imagenes. Edición 3a. 2002.
40. FISHER, GH. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell 1995;81:935-946.
41. FLORES-PÉREZ Fernando Iván. La muerte celular programada (apoptosis). Departamento de Morfología, Sección de Histología y Biología Celular, Laboratorio de Biomorfología Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Veterinaria México. 2002 ; 33(2).
42. FORMIGLI L. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharingapoptosis and necrosis. Journal of Cellular physiology. 2000; 182(1):41-9.
43. GAFFNEY, E.F, O'neill A.J, Stanton M.J. In situ endlabelling, light microscopic assesment and ultraestructure of apoptosis in lung carcinoma. J Clin Pathol 1995;48 :1017-21.
44. GASKIN, J.M. Testing for caprine arthritis- encephalitis (CAE). Dairy Goat J, 1990 ; 68 (4) : 231-237
45. GAVRIELLY Y, Sherman Y, Ben-Sanson S.A. Identification of programmed cells death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol, 1992 ;119 :493-501.
46. GENDELMAN, R. Productive replication of caprine arthritis-encephalitis virus is associated with induction of apoptosis. Journal of General Virology 1997.78:801-805.
47. GÓNZALEZ, F. Gustavo. Fisiología reproductiva masculina. Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2000.
48. HECKERT, R.A. ; Mc Nab, W.B ; Richardson, S :M ; Briscoe ,M.R. Evaluations of an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay for detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. Can. Vet : Res. 1992 ;56 :237-241.
49. ITOH, N, Yonehara S, Ishii A. The polypeptide encoded by the cDNA for humancell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991;6:233-43;
50. JARPA, Orrego Santiago. Apoptosis (Muerte Celular Programada). Facultad de Medicina. Universidad de Chile, 1999.
51. JIMENEZ, Ma. Fernanda. La apoptosis en procesos patológicos. Bogota, Colombia,2002.

52. JONDAL M; Xue Y, McConkey DJ, Okret S. Thymocyte apoptosis by glucocorticoids and cAMP. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 200:67-79.
53. KAGI D, Vignaux F, Ledermann B, Depraetere V. Fas and perforin pathways as major mechanisms of t cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-30)
54. KERR, J.F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1992 ;26 :239.
55. KLEVJER-Anderson, P. and P. Cheevers. Characterization of the infection of the caprine synovial membrane cells by the retrovirus AEC virus. *Virology*, 1981; 110: 113-119.
56. KNIGHT, A. and M. Jokinen. C.CAE. *Continuing Education USA*, 1982; 4 (6): 63-70.
57. LENNETTE, H. Edwin, Laboratory Diagnosis of viral infections. 3a. Edición. Marcel Dekker Inc. USA 1996 ; 226,532.
58. LIPPINCOTT; Williams. Representación esquemática de fallas de muerte celular programada. Copyright, 1998.
59. LÓPEZ, Baños Benito ; Chávez Gómez María Elena. Manual de uso del paquete estadístico Nwa statpak , un enfoque a la biomedicina. FESC, UNAM, 1994 : 152-156.
60. LOPEZ-HOYOS, M. Regulación de la apoptosis en linfocitos B y T por los genes Bcl-X. *Rev. Esp. Reumatol* 1998; 25: 63-73.
61. MERINO, G. Nelson. Apoptosis: Experiencias en la anaatomía patológica experimental. *Rev. Cubana. Invest. Biomed*, 2001 ; 20 (2) :159-60.
62. MEYN RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D, Radiation-induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and p53 status. *Int J Cancer* 1996; 66: 466-72.
63. MEZQUITA, P. Cristóbal. Las mutaciones del gen BRCA1 aumentan notablememnte el riesgo de cáncer de mama. V Master de patología Mamamria- Senología, 2000-2001.
64. MIYAKE, H ; Hara, I ; Yamanaka, K ; Arakawa, S ; Kamidono, S. Synergistic enhancement of resistance to cisplatin in human bladder cancer cell by over-expression of mutant-type p53 and Bcl-2. *J. Urol*, 2001 ; 162(6) : 2176-81.
65. MURPHY, Frederick A ; Gibbs, E.P.J ; Horznek, M.C ; Sttudert, M.J. Veterinary Virology. Third edition. Academic press. USA, 1993 ; 385-86.
66. NARAYAN, O., J. Clements., S. Stranberg., L. Cork and D. Griffin. Biological characterization of the virus causing leukoencephalomyelitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol*, 1980; 50: 69-79.
67. NARAYAN, P., D. Shaffer, D. Griffin, J. Clements and J. Hess. Neutrilizing antibodies to the CAE lentovirus in persistently infected goats that overcome by immunization with inactivated M.Tuberculosis. *J. Virol*. 1984; 49 (2):349-355.
68. NÁZARA, CS de J ; Trigo, F.J ; Suberbie, E ; Madrigal, V. Estudio Clínico-Patológico de la Artritis- Encefalitis Caprina en México. *Vet. Mex*, 1985 ;16 :91-100.

69. NOVELO, R. H. A., Martínez, A., Tortora, J. and Ramírez, A. Serological diagnosis of caprine arthritis encephalitis using an immunodiffusion test on bucks. 7th International Conference on Goats, Tours, France, 2000; 819.
70. NUÑEZ G, Merino R, Grillot D, González-García M. Bcl-2 y Bcl-x regulatory switches for lymphoid death and survival. Immunol. Today 1994; 15(12):582-88.
71. OEHM A, Behrmann I, Falk W. Purification and molecular cloning of the Apo-1 cell antigen A. 1992
72. OLIVER, R., A. Chatcart., R. McNieves., R. Pole and G. Robati. Infection of lambs with CAE by feeding milk from infected goats. Vet. Rec.1983 ; 116 (3):3518.
73. OLTVAI ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog. Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74:609-19.
74. OSBORNE BA, Schwartz LM. Essential gens that regulate apoptosis. Trends in Cell. Biol. 1994; 4:394-99.
75. PETTURSON, G ; Georgsson, G ; Palsson, P.A. Maedi-Visna and related disease. Vol. 3 In : Virus infections of ruminants. New York USA. Elsevier Amsterdam. 1992 ;431-440.
76. PUTNEY, J and Anderson D. Orchitis and human immunodeficiency virus tipe 1 infected cells in Reproductive tissues from men with the adquired immune deficiency syndrome. Am.J Pathol ; 1991 ; 139 : 149-161.
77. RABBANI, F ; cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. Urol. Clin. North Am, 2000. 27(1) : 83-102, IX)
78. RAYA Gendelman. Productive replication of caprine arthritis-encephalitis virus is associated with induction of apoptosis. Journal of General Virology (1997), 78:801-805.
79. RIVA, D ; Perfetti, X ; Gadaleta, P ; Coulombie, F ; Mersich, S. Comparación de la apoptosis inducida por los virus de VSV e Influenza in-vitro. Laboratorio de Virología. Departamento de Química Biológica, FCE y N, UBA, 2001.
80. ROBINSON, W.R. and Ellis, T.M. Caprine arthritis- encephalitis virus infection : from recognition to eradication. Aust. Vet. J. 1986 ;63 (8) : 237-341.
81. ROSETO, Alberto ; Brenner, Catherine. Apoptosis o la Muerte Celular Programada. Arch. Argent. Pediatr, 1999 ; 97(4) : 253-75.
82. SCHWARTZ RH. Immunological Tolerrance. Fundamental Immunology, Third Edition, Edited by William E. Paul Raven Press Ltd, New York. 1993.
83. SHERMAN, D. Viral leukoencephalomyelitis in two Minnesota goats. V. M. SAC. 1978 ; 73: 1439-1440.
84. SMITH, M.C ; Sherman, D.M. Goat medicine. Lea and Febiger, USA, 1994 : 135-138.
85. STRAND, S Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cellsa mechanism of immune evasion. Nature Med 1996, 2.1361-1366.

86. SUDA T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993; 75:1169-78)
87. SYDNEY, Brenner, Sulston John, Horvitz Robert. La apoptosis y los virus. Premio Nobel 2002. Oficina de Prensa FCE y N-UBA.
88. TANAKA H, Shilbagaki I, Shimada Y, Wagata T, Imamura M, and Ishizaki K. Characterization of p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: Increased frequency and different spectrum of mutation from primary tumors. Int J. Cancer 1996; 65:372-76.
89. TIMM, E. A. et al. Discrimination between dead and viable apoptotic cells using two-color TdT assay and surface labeling as detected by flow cytometry. 1996, Biochemical 1:44-47.
90. TRAVASSOS, CE, Benoit C, Valas S, Da Silva A.G, Perrin G. Caprine Arthritis Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. Small Ruminant Research, 1999; Vol. 32.
91. TRIGO, J. F. La Artritis Encefalitis Caprina. Ciencia Veterinaria. 1991 ; 5 : 49-66.
92. TUCEK-SCABO C, Andjelic S, Lacy E, Elkou KB, Nikolic-Zignic J Surface T cell Fas Receptors /CD95 Regulation, in vivo Activation and apoptosis. J Immunol. 1996;156(1):192-00
93. VAN PARIJS L; Abbas AK. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol 1996; 8:355-361.
94. VILLAROEL, Lorena; Couve, Eduardo. Mitocondrias y apoptosis. Microscopios Freevers, Valparaíso, Chile 1999.
95. YUDE Sun. Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to Pasterella haemolytica leukotoxin. AJVR, 2000 ; No.61, 1:51-56.