



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

**“CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS EN
EL TRACTO REPRODUCTOR DE CARNEROS CLÍNICAMENTE
SANOS, ESTRESADOS E INFECTADOS CON *Brucella ovis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

DIANA ISABEL MARTÍNEZ PÉREZ

ASESOR:

DR. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2013.



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos LA TESIS:

“Caracterización y cuantificación de apoptosis en el tracto reproductor de carneros clínicamente sanos, estresados e infectados con *Brucella ovis*”

Que presenta la pasante: Diana Isabel Martínez Pérez
Con número de cuenta: 30317345-4 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 7 de Septiembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez	
VOCAL	MPA. Rosalba Soto González	
SECRETARIO	MC. Juan Sebastián Barrientos Padilla	
1er SUPLENTE	MVZ. Yasmín Luis Ceballos	
2do SUPLENTE	MVZ. Omar Salvador Flores	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

*Al círculo de fuego:
los que ya se han ido,
los que están presentes
y los que aún tienen que llegar...*

A la memoria de Víctor Hugo Ramírez Pérez

Con todo mi cariño para ti... fuiste mi mejor amigo y hasta el fin de mis días lo seguirás siendo. Te quiero mucho y éste es el primer triunfo de los muchos que te seguiré dedicando... me duele que no estés físicamente, pero entiendo que donde estas te encuentras bien y sé que en cada viento que acaricia mi rostro te encuentras tú...

Te quiero.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este estudio fue financiado por los Proyectos: Cátedra de investigación: “Patología y enfermedades de los rumiantes” CON-209 y proyecto PAPIME PE-201010. Pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Se agradece el PASPA para estudios de doctorado, proporcionada por la DEGAPA de la UNAM, para Germán Isauro Garrido Fariña. Se agradecen las facilidades otorgadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, Palo Alto).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, el hecho de haberme bendecido con la familia que tengo; los amo a todos... agradezco a mi mamá, por su apoyo incondicional, por su paciencia para guiarme en el día a día, a mi padre porque incluso con el silencio me brinda enseñanzas, a mi hermano, que ha sido participe y protagonista de grandes experiencias, y del cual siempre aprendo mucho, agradezco a mi sobrina Jehieli, porque incluso antes de conocerte, eras ya un aliciente más de lucha y superación, quiero ser un buen ejemplo para ti...

Agradezco a Miriam Lira, Erandi Pastrana, Yudibeth Sixto, Paulina Guzmán y Paulina Montiel, por ser mis mejores amigas y compartir conmigo tristezas y alegrías en cada etapa de la vida.

A mis profesores: Dr. Jorge Tórtora y Dr. Germán Garrido, por la confianza depositada, y apoyo total a lo largo de este proyecto, son grandes personas, y por tanto, excelentes profesores, los aprecio mucho. Al Dr. Miguel Ángel Pérez Razo, por su apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

Al Dr. Efrén Díaz, Dra. Gabriela Palomares, Dr. Francisco Morales y M. En C. Guadalupe Martínez (INIFAP), al MVZ. José María Carrera (Fundación Zacatecas Produce), Al Dr. Tonatiuh Cruz y al Dr. Juan Carlos del Río (FES-C), por las facilidades brindadas para la realización de esta tesis. A mis compañeros de Laboratorio: Erandi Pastrana, José Luis Gutiérrez, Gabriela Castillo y Sra. Leo.

A mis sinodales: Dr. Jorge Tórtora, M. En C. Juan Barrientos, MPA. Rosalba Soto, MVZ. Yasmín Luis y MVZ. Omar Salvador, por sus amables aportaciones a esta tesis. A todas las personas que han colaborado en mi formación académica y personal, y de manera muy especial a mi *alma mater*, mi querida Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y por ende, a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme todas las herramientas para lograr mis metas...

INDICE GENERAL

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Marco teórico	5
IV.	Justificación	21
V.	Objetivos	22
VI.	Hipótesis	23
VII.	Material y métodos	24
VIII.	Resultados	26
IX.	Discusión	33
X.	Conclusiones	34
	Anexos	35
	Bibliografía	42

Capítulo I

RESUMEN

Resumen

Se evaluó la ocurrencia de apoptosis en tejidos del tracto reproductor de machos ovinos clínicamente sanos, obtenidos en rastro y seropositivos con lesiones iniciales de epididimitis por *B. ovis*. Se trabajó con tres grupos de carneros entre 18 y 24 meses de edad, el primer grupo de 25 carneros, clínicamente sanos, se muestrearon al momento del sacrificio en rastro, y se emplearon las muestras seronegativas a *B. ovis* (grupo control); el segundo grupo, 10 carneros sometidos a estrés y seronegativos a *B. ovis* (grupo experimental), y el tercer grupo, 8 carneros positivos a *B. ovis* con lesiones características de epididimitis (grupo experimental). La apoptosis, en los tejidos del tracto reproductor del macho ovino, aún no ha sido descrita ni se ha descrito en otras especies; conocer las condiciones de este proceso bajo las condiciones propuestas, coadyuvará al estudio del complejo salud-enfermedad de este aparato.

Las muestras se procesaron por el método de inclusión en parafina de rutina, se obtuvieron cortes de 4µm de espesor, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE), naranja de acridina (NA) y TUNEL; las células con morfología sugerente de apoptosis se identificaron en la tinción de rutina HE y NA, y se confirmaron con la tinción de TUNEL. Se contaron las células positivas en al menos 10 campos no confluentes elegidos al azar de cada órgano. En vesícula seminal se contaron en promedio 5 células positivas, en ampulla del conducto deferente 1, en uretra 7, en próstata 1, en epidídimo 2, y en testículo no se demostraron células en apoptosis. Los datos fueron analizados con el programa Statgraphics. No se demostraron diferencias significativas en los conteos de células en apoptosis entre órganos ni entre los grupos con respecto a los órganos analizados. Estos resultados indicarían que la ocurrencia de apoptosis, en el tracto reproductor del macho, no fue afectada por el estrés y/o la infección por *B. ovis*.

Capítulo II. INTRODUCCIÓN

“CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS EN EL TRACTO REPRODUCTOR DE CARNEROS CLÍNICAMENTE SANOS, ESTRESADOS E INFECTADOS CON *Brucella ovis*”

Apoptosis,

Vocablo griego que se compone de dos raíces: *apo* que significa separación o derivación, y *ptosis* que significa caída. Este era un término empleado en la antigua Grecia, para describir la caída de los pétalos de las flores, y la caída otoñal de las hojas de los árboles ⁽¹⁾. Esta idea, deja claro el carácter fisiológico de la apoptosis; actualmente, cuando se habla de apoptosis, se hace referencia al proceso fisiológico de muerte celular, en el que la muerte ocurre de forma controlada, en respuesta a diversos estímulos ⁽²⁾ y se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos. El fenómeno de apoptosis es uno de los principales procesos que mantiene el equilibrio de proliferación y muerte celular en todos los tejidos, lo que permite la conservación de la arquitectura de los mismos ^(1, 3, 4).

Se ha señalado que este proceso de muerte celular programada es de vital importancia para los organismos multicelulares ⁽⁵⁾, ya que está íntimamente relacionado con los eventos de diferenciación celular, como el desarrollo embrionario, el sistema hematopoyético y la atresia folicular ^(6, 4); sin embargo, también se debe acotar que en ocasiones este programa de muerte celular, puede sufrir alteraciones, lo que lleva a la expresión de enfermedades neoplásicas, síndromes mielodisplásicos y enfermedades neurodegenerativas ^(2, 7, 8).

Existen marcadas diferencias entre necrosis, y apoptosis. La muerte celular mediada por necrosis carece de un programa de regulación genética, es decir, se da como respuesta a estímulos dañinos, como hipoxia, agentes físicos, químicos, fármacos y biológicos; al microscopio ofrece una imagen caracterizada por núcleos picnóticos y tumefacción celular, la membrana celular esta desestructurada, lo que permite la liberación de enzimas citoplasmáticas al medio extracelular, y se activan mecanismos inflamatorios, estos cambios evidencian la culminación de la lesión celular irreversible ⁽⁸⁾.

En la apoptosis, la imagen microscópica observada es de condensación citoplasmática con disminución en el volumen celular ⁽³⁾, la membrana plasmática se aprecia intacta, y en el citoplasma eventualmente ocurrirá la inclusión de los organelos celulares, en lo que se denominan cuerpos apoptóticos, al no existir un desequilibrio en la permeabilidad de la membrana, las enzimas citoplasmáticas no son liberadas y no hay cambios inflamatorios en los tejidos adyacentes. Todos estos cambios morfológicos obedecen en el caso de la apoptosis, a la ejecución de un programa genético que supone, la activación de diferentes rutas y señalizaciones bioquímicas ^(2, 8).

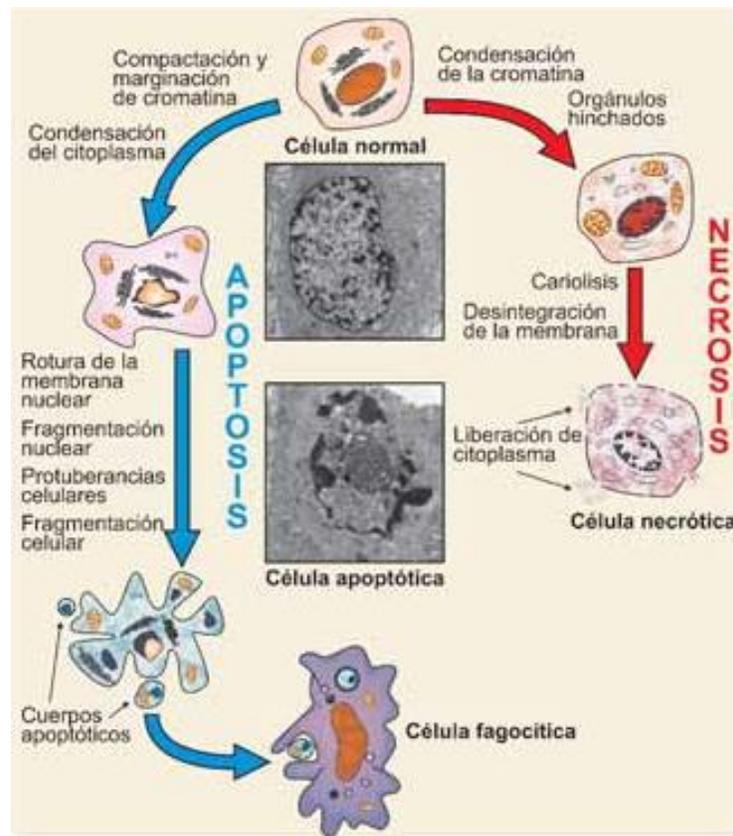


Figura 1. Comparación esquemática que señala diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis. Tomado de Lizalbé, 2007. ⁽⁹⁾

Hasta el momento se describe a la apoptosis como un proceso fisiológico, de carácter conservador ⁽³⁾, sin embargo también se reconoce que en ocasiones este proceso sufre alteraciones en su ejecución, lo que deriva en la expresión de enfermedades que afectan tanto al hombre como a los animales ^(3, 8, 10).

El fenómeno de apoptosis es relevante en todos los organismos multicelulares ⁽¹¹⁾ y ofrece particularidades entre cada órgano y sistema, son justamente estas particularidades lo que hace importante estudiar a la apoptosis desde diversos enfoques; por un lado, como mecanismo responsable del control de la proliferación celular, pero también como oportunidad de causar diversos padecimientos si factores genéticos, ambientales o infecciosos pudieran alterarlo ⁽¹²⁾.

La apoptosis en los tejidos y células de respuesta inmune del tracto reproductor del macho ovino aún no ha sido descrita, ni se ha descrito en otras especies, esto cobra importancia, ya que debido a la presencia de la barrera hematotesticular, puede implicar características especiales en el fenómeno. Conocer las condiciones de apoptosis en animales normales, coadyuvará al estudio del complejo salud-enfermedad de este aparato.

Capítulo III.
MARCO TEÓRICO

En el año de 1665 Robert Hooke describió a las células como cavidades o celdillas, en la estructura microscópica del corcho, ⁽¹¹⁾ desde entonces múltiples investigadores realizaron importantes aportaciones, a lo que después se conocería como Teoría celular.

El estudio de esta Teoría comprende también los procesos de muerte celular, Rudolf Virchow en 1858 describió la muerte celular por necrosis ⁽¹²⁾, después William Councilman en 1890 describe la presencia de cuerpos acidófilos vacuolados en hígados de pacientes con fiebre amarilla y posteriormente Robert Schröder en 1914, reporta el aspecto picnótico de los núcleos en células de las glándulas endometriales, dos o tres días antes del inicio de la menstruación. En 1965, el patólogo australiano John Kerr y colegas, realizan la descripción detallada de este tipo de muerte celular, llamándola “necrosis por encogimiento”. En 1972, este mismo grupo de investigadores publicó un artículo en el cual afirmaban que el mismo tipo de muerte celular ocurría no sólo durante los procesos de embriogénesis, sino que se mantenía constante a lo largo de toda la vida, de igual manera proponían que una iniciación inadecuada de este proceso, o su inhibición, podría contribuir a la presentación de diversas enfermedades; con este trabajo, se sientan las bases para el estudio formal de este fenómeno y son ellos también quienes sugieren el término hasta hoy empleado: apoptosis ^(13, 1, 7).

En la década de los 80's, Sidney Brenner y su equipo inician los estudios correspondientes a los mecanismos moleculares que regulan el proceso de muerte celular ⁽¹⁴⁾, los estudios genéticos tuvieron como modelo biológico al nematodo *Caenorhabditis elegans*; gracias a estos trabajos, se identificaron algunos de los genes involucrados en el control de la apoptosis, dejando en claro la importancia de este proceso y sentando las bases para estudios posteriores, en los que eventualmente se identificaron también a los genes homólogos en humanos, que tienen la facultad de inhibir o iniciar la apoptosis.

En medicina veterinaria no existen trabajos acerca del papel de la apoptosis en el tracto reproductor de machos clínicamente sanos, en ninguna especie. Conocer este aspecto, podría coadyuvar al estudio del proceso de salud-enfermedad en este aparato.

3. Tracto reproductor del carnero

El aparato reproductor del macho se encuentra conformado por testículos, glándulas accesorias y pene. Cada uno de estos órganos poseen características particulares, que comprenden diferencias histológicas y funcionales ⁽¹⁵⁾.

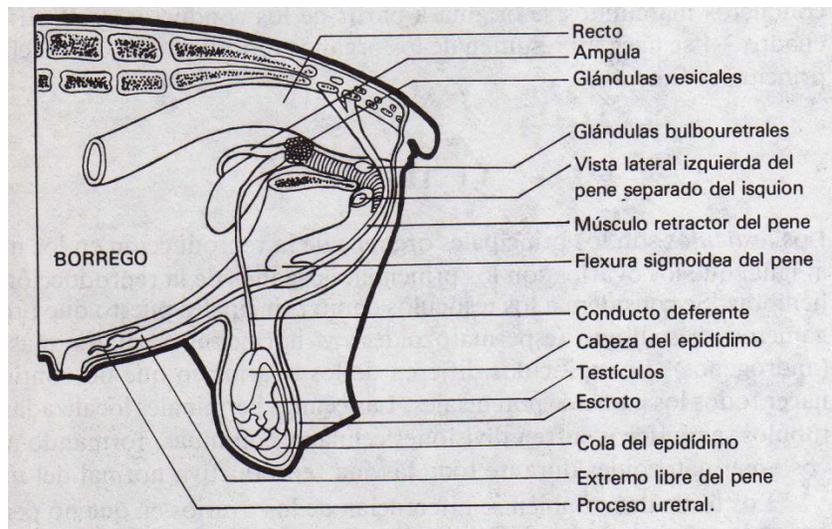


Figura 2. Esquema del tracto reproductor del carnero, vista lateral. Tomado de Bearden & Fuquay. 1982 ⁽¹⁶⁾.

3.1 Testículos.

En la vida embrionaria, los testículos son gónadas indiferenciadas derivadas de las crestas urogenitales y se encuentran a ambos lados de la línea media entre los mesonefros y el mesenterio dorsal ^(17, 18). Las gónadas de hembra y macho, tienen en común tres orígenes:

- Mesodermo intermedio que formará las crestas urogenitales en la pared abdominal posterior.
- Epitelio mesodérmico (mesotelio celómico) que tapizará las crestas urogenitales.
- Células germinales primordiales que migraran desde el saco vitelino hacia las gónadas en desarrollo, donde se dividen y diferencian en espermatogonias ⁽¹⁸⁾.

3.1.1 Diferenciación gonadal.

El sexo genético se determina en el momento de la fecundación, por la presencia o ausencia del cromosoma Y. El sexo gonadal está determinado por el gen *SRY*; la presencia de una proteína específica que se une al DNA, llamada *factor determinante testicular (TDF)* y codificada por el gen *SRY*, es la causa directa del desarrollo y la diferenciación testicular ⁽¹⁸⁾.

La diferenciación gonadal comienza con la migración de las células germinales primordiales desde el endodermo del intestino y el epitelio del saco vitelino, a través del mesenterio hasta las crestas urogenitales, esta migración induce la proliferación de las células mesodérmicas de las crestas urogenitales y las células del mesotelio celómico para que se desarrollen los cordones sexuales primitivos, posteriormente estos primordios se diferencian en los cordones testiculares que darán origen a los túbulos seminíferos y los túbulos rectos; la *rete testis* se deriva del mesonefros, al igual que los conductos eferentes. Las células de Leydig, derivan del mesénquima que separa los cordones testiculares, estas células son las responsables de la producción de testosterona, hormona que estimula el desarrollo del primordio indiferente en testículo. Las células de Sertoli se desarrollan en los cordones testiculares, y comienzan a producir el *factor inhibidor mülleriano (MIF)*, este factor es una glucoproteína que inhibe la división celular de los conductos paramesonéfricos (de Müller). El desarrollo y la diferenciación de los genitales externos ocurren de manera paralela, y ocurre por el efecto de la *dihidrotestosterona (DHT)* ⁽¹⁷⁾.

En vida adulta, los testículos se ubican dentro de la bolsa escrotal, rodeados por músculo liso (túnica dartos), fascia y peritoneo y son glándulas de función endocrina y exocrina.

En el testículo se diferencian la túnica albugínea, septos de tejido conectivo y el mediastino testicular. Histológicamente se encuentran lobulillos testiculares, a su vez formados por túbulos seminíferos que es el sitio donde se producen los espermatozoides y un estroma compuesto por células intersticiales de Leydig que son las responsables de la producción de testosterona. El epitelio de los túbulos seminíferos está compuesto por las células de Sertoli (sustentaculares) y por las células del epitelio germinativo, que tras divisiones celulares sucesivas, darán origen a los espermatozoides ⁽¹⁹⁾. En los túbulos seminíferos también existe una estructura llamada Barrera hematotesticular, formada por la unión de las células mioideas, y por uniones celulares de tipo zonula occludens entre las células de Sertoli; esta barrera de permeabilidad selectiva es responsable entre otras cosas, de mantener a las células germinales aisladas del sistema inmune ⁽¹⁷⁾.

3.2 Epidídimo

Es una estructura tubular adyacente al testículo, en la que se distinguen tres regiones anatómicas: cabeza, cuerpo y cola, que se continua con el conducto deferente; la última porción de este conducto, corresponde a las ámpulas del conducto deferente, dilataciones con estructuras glandulares. En el epidídimo se llevan a cabo funciones de transporte, maduración y almacenamiento de espermatozoides. Su epitelio es columnar, estereociliado y pseudoestratificado ^(18, 15, 17).

3.3 Uretra

Es la continuación del sistema de conductos que se originan en la vejiga urinaria y abre al exterior. Su función es la de transporte tanto de material seminal como de la orina. El material seminal llega a la uretra en su porción pélvica en el colículo seminal que es el ápice de la cresta uretral; en este punto, se abren en la uretra los conductos deferentes, las glándulas vesiculares y algunos conductos

prostáticos. Histológicamente, se reconoce la presencia de tejido eréctil y de glándulas tubulares, de secreción mucosa, también llamadas glándulas uretrales (15).

3.4 Pene

Anatómicamente se reconocen tres componentes: raíz, cuerpo y glande. Histológicamente, se define la presencia de dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso. Su función es la de expulsar la orina y permitir el transporte y depósito del material seminal durante la cópula (18).

3.5 Glándulas accesorias

Las glándulas accesorias del carnero son: vesícula seminal, ámpulas del conducto deferente, glándula bulbouretral y próstata diseminada. En conjunto, estas glándulas se encargan de secretar una serie de sustancias como fructosa y aminoácidos, que entre otras funciones, coadyuvan a la limpieza del conducto uretral antes de la eyaculación, además de ser secreciones con elementos nutritivos para los espermatozoides en el interior del conducto genital de la hembra (17; 15).

3.5.1 Ámpula del conducto deferente

Es un ensanchamiento del conducto deferente. Su organización histológica es de glándula tubuloalveolar, revestida por un epitelio columnar simple. Su secreción coadyuva al transporte de los espermatozoides (18).

3.5.2 Próstata

En los carneros, la próstata se encuentra de manera diseminada sobre la cara dorsal de la uretra pélvica, y se extiende en sentido caudal hasta los conductos de las glándulas bulbouretrales (20). La secreción prostática en los rumiantes, representa del 4 al 6% del volumen total del eyaculado (18). Su organización es tubuloalveolar compuesta, y está revestida por epitelio cuboidal simple. El sistema

de conductos está revestido por un epitelio columnar simple, y sus alveolos están rodeados por tejido conectivo laxo de la lámina propia ⁽¹⁵⁾.

3.5.3 Glándulas bulbouretrales

Glándula par ubicada en posición dorsal a la uretra; la secreción de esta glándula constituye la fracción del preeyaculado, que se encarga de limpiar y lubricar la uretra. Al microscopio, se aprecia una organización tubuloalveolar, con un epitelio columnar simple, el sistema de conductos está revestido por un epitelio columnar pseudoestratificado, y la cápsula del órgano es de tejido conectivo denso, que se continúa como componentes septales ^(18, 15).

3.5.4 Vesícula seminal

Son resultado de las invaginaciones del conducto deferente distal a la ampolla ⁽¹⁷⁾. Se constituyen de un epitelio columnar pseudoestratificado, de una túnica muscular de capas circulares internas y longitudinales externas, finalmente posee una túnica adventicia de tejido conectivo laxo ⁽¹⁵⁾. Los productos de secreción de la glándula vesicular, son principalmente fructosa, que es el sustrato metabólico principal de los espermatozoides, además de aminoácidos, ácido ascórbico y prostaglandinas ⁽¹⁷⁾.

3.6 Mecanismos reguladores de la muerte celular programada

El fenómeno de apoptosis se encuentra estrechamente controlado por mecanismos moleculares que si bien es cierto, son activados por vías distintas, en última instancia culminan en la activación de diversas moléculas, entre ellas las caspasas; estas enzimas intracelulares, se encargan de la promoción y ejecución de algunas fases de este proceso. El código genético responsable de la iniciación y ejecución de la apoptosis, codifica estas proteínas intracelulares fundamentales para inducir la muerte celular ⁽²⁾. Se conocen dos mecanismos iniciadores de la apoptosis:

- Vía extrínseca
- Vía intrínseca

3.6.1 Vía extrínseca

También llamada muerte iniciada por el receptor, pues involucra interacciones mediadas por receptores transmembranales. Esta vía de iniciación de apoptosis, se caracteriza por que sus receptores son parte de la superfamilia del Factor de necrosis tumoral (TNF); estos receptores poseen un dominio de muerte citoplasmático; gracias a este dominio, son factibles las interacciones proteína-proteína; estas interacciones provocan la formación de ligandos externos, que favorecen que los receptores de TNF formen sitios de unión para las proteínas adaptadoras, éstas, a su vez, reclutan y activan múltiples moléculas de caspasas (8, 21).

Las principales proteínas que regulan la inhibición o activación de las caspasas son miembros de la familia Bcl-2, que codifica proteínas intracelulares; entre estas proteínas se jerarquizan *bax* y *bak*.

3.6.2 Vía intrínseca

Se le llama vía intrínseca o mitocondrial, esta vía de apoptosis se presenta cuando el metabolismo respiratorio de la célula es dañado (8). Se inicia con la liberación de sustancias proapoptóticas, como el citocromo *c*, y Smac/DIABLO, desde la mitocondria hacia el citosol; la función de estas sustancias es activar la cascada de apoptosis mediante la inhibición y sustitución en la membrana mitocondrial de proteínas antiapoptóticas, las familias más importantes de estas proteínas son la familia IAPs, BCL-2, y FLIP. La sustitución de las sustancias antiapoptóticas, genera la liberación de proteínas activadoras de caspasas, que se encargaran de degradar algunos componentes del citoesqueleto y membrana citoplasmática, algunas otras, activaran endonucleasas y topoisomerasas (DNAsa activada dependiente de Ca^{++} y Mg^{++}) que se encargan de la fragmentación del DNA, en el patrón característico de 180 a 200 pb (1, 21).

La familia IAPs es regulada por Smac, es decir, el complejo Smac funciona como una molécula pro-apoptótica al comportarse como un regulador negativo de las IAPs.

La familia BCL-2 regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial y por tanto, la liberación del Citocromo-C. Esta familia tiene entre sus miembros, moléculas de función pro y anti-apoptosis; Bcl-2 y Bcl-X_L se ubican en la membrana externa mitocondrial, inhibiendo la liberación del citocromo C, mientras que Bad, BID, Bax y Bim, se ubican en el citosol y se translocan a la mitocondria, una vez recibida la señal de apoptosis, promoviendo la liberación del citocromo C ⁽¹⁾. La familia FLIP también inhibe la apoptosis, principalmente la inducida por los receptores Fas y TNFR1.

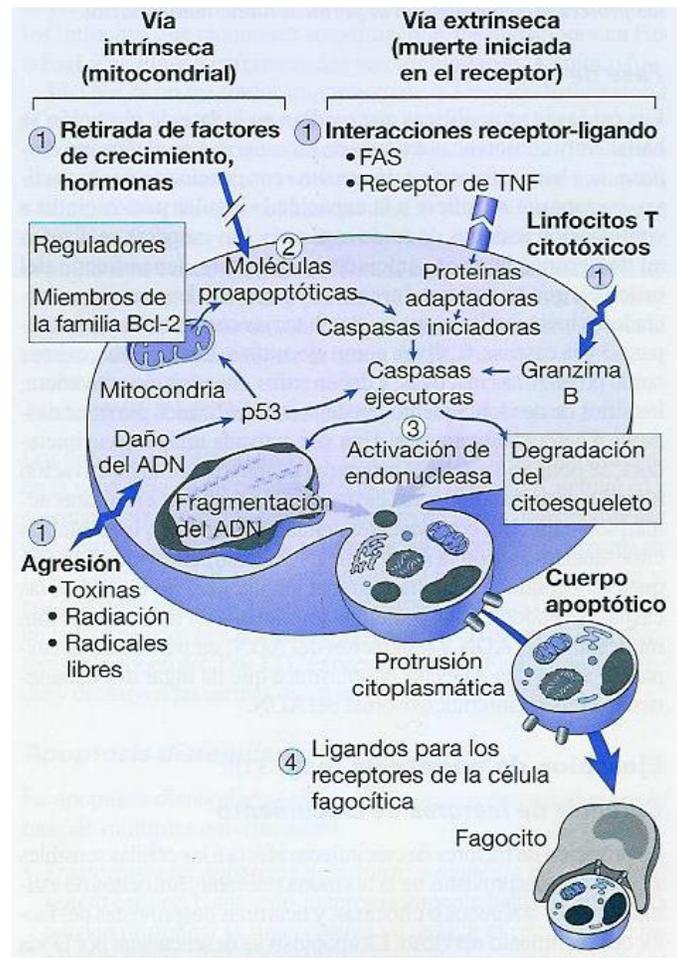


Fig. 3. Esquema de las dos vías de señalización de apoptosis. Tomado de Mitchell, 2007 ⁽⁸⁾.

3.7 Morfología y fases de la apoptosis

Morfológicamente, se describen tres fases de la apoptosis: reducción del volumen celular, formación de cuerpos apoptóticos que contienen a los organelos intactos y

finalmente la degradación de las vesículas apoptóticas ⁽²²⁾. Estos cambios visibles al microscopio, se acompañan de cambios bioquímicos en función de la vía utilizada, mismos que se pueden evidenciar con inmunohistoquímica y citofluorometría ⁽¹⁾.

3.7.1 Fase de iniciación.

Los iniciadores de la apoptosis pueden ser hormonas, citosinas, microorganismos, fármacos y/o radiaciones; estos inductores activarán cualquiera de las dos vías descritas; en el caso de la vía extrínseca, se formarán ligandos y se acoplarán proteínas, que a su vez activarán diversas caspasas, mientras que en la vía intrínseca, la señal de inicio es la liberación de proteínas proapoptóticas de la matriz mitocondrial, mismas que activarán otras cascadas de caspasas.

3.7.2 Fase de ejecución.

Los mayores cambios bioquímicos y morfológicos ocurren en esta fase. Los niveles de Ca^{++} intracelular aumentan por la entrada de este ion desde el exterior, y por su liberación desde mitocondrias y el retículo endoplásmico; este Ca^{++} activa algunas endonucleasas y proteasas, que modifican proteínas del citoesqueleto y de la matriz nuclear, esto provoca la escisión internucleosomal del DNA y al microscopio se observa uno de los primeros cambios morfológicos, la disminución del volumen celular y bioquímicamente, la degradación del material genético en fragmentos de 180 a 200 pb ⁽³⁾.

Posteriormente, la célula en apoptosis condensa el material genético fragmentado, y forma un número variable de vesículas, estas vesículas son evaginaciones de la membrana plasmática, contienen parte de la cromatina, algunos organelos celulares intactos y reciben el nombre de cuerpos apoptóticos. Esta fase, es visible al microscopio óptico.

3.7.3 Fase de eliminación.

La eliminación de los cuerpos apoptóticos es un proceso rápido y eficiente, realizado por células fagocíticas, aunque las células dendríticas, epiteliales y

fibroblastos también pueden eliminar a las células que han sufrido apoptosis. El hecho de que las células que sufrieron apoptosis sean eliminadas por uno u otro tipo celular, depende en gran medida, del mecanismo de reconocimiento que estas células empleen. La literatura indica que este evento involucra diversos receptores que podrían actuar de forma aislada, simultánea o en secuencia. Uno de los mecanismos de reconocimiento más estudiado, es la exposición en la membrana externa de moléculas de fosfatidilserina, consecuencia de la pérdida de simetría en la membrana celular ⁽¹⁾.

3.8 Genes moduladores de la apoptosis

El inicio de la muerte celular programada, es un proceso complejo, que depende de la activación sistemática de un grupo de genes, que a grandes rasgos se podría mencionar, codifican proteínas con funciones particulares; fragmentación de DNA, modificación del citoesqueleto y regulación de la muerte celular. Además, gracias a los estudios realizados en *C. elegans*, también se pudieron identificar algunas de las mutaciones que afectan este proceso.

A partir del estudio de apoptosis en *C. elegans*, se logró identificar a *ced-3* y *ced-4*, genes que en ausencia evitan la muerte; por otra parte *ced-9* funciona como regulador negativo de apoptosis. Cuando *ced-9* presenta mutaciones que lo inactivan, las células que regularmente sobrevivirían, no lo hacen; pero si *ced-9* se expresa en exceso, entonces células que no deberían sobrevivir, sobreviven ^(23, 24).

En mamíferos, se identificaron los genes homólogos de *ced-3*, *ced-4*, y *ced-9*. Cada uno de estos genes, está relacionado con la expresión de proteínas reguladoras de apoptosis; *ced-4* (Apaf-1 en mamíferos) y *ced-9*, en mamíferos está relacionado a la expresión de la familia Bcl-2, algunos miembros de esta familia actúan como inhibidores de la activación de caspasas, mientras que otros, promueven la apoptosis ^(5, 24).

Otras vías de inhibición de la apoptosis, se pueden apreciar en el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, proceso en el cual, cerca del 50% de las neuronas, morirán por apoptosis, esto indica dos situaciones: que la mayoría de

las células en los animales superiores están programadas para sufrir apoptosis, y que, aquellas que sobreviven al desarrollo y remodelación, han recibido una cantidad suficiente de señales de supervivencia; estas señales de supervivencia son modulados por estímulos de crecimiento extracelular, o bien, a través de interacciones célula-célula ⁽⁵⁾.

El gen de la proteína p53, es el modulador responsable de las funciones de la familia Bcl-2. En recientes estudios, p53 es señalado como un gen de suma importancia, debido a que actúa en procesos tan diversos como la detección de daño en el ADN, lo que detendrá el ciclo celular para reparar el material genético, pero también p53 es responsable de la iniciación de la apoptosis, cuando este daño no puede ser reparado ^(5, 22).

3.9. Apoptosis, su importancia en los procesos de enfermedad

Ya se señaló el carácter fisiológico del proceso de apoptosis, pues participa en eventos como la diferenciación embrionaria, la maduración de células sanguíneas y la destrucción de células de respuesta inmune y por lo mismo es importante acotar que cuando este mecanismo conservado sufre alteraciones, entonces es factible el desarrollo de diversos padecimientos que afectan tanto al hombre como a los animales ⁽³⁾.

El ejemplo más recurrido es el cáncer, padecimiento que se define como la proliferación celular excesiva, sumada a la “incapacidad” de las células para morir; algunos estudios, señalan que en el 50% de los pacientes con diferentes tipos de cáncer, el gene que codifica para la proteína p53, se encuentra mutado; la importancia de este gen, radica en su actividad en el control del ciclo celular, la integridad del ADN, y la supervivencia de las células que han sido expuestas a agentes dañinos; este dato deja en claro la importancia de conocer la señalización de la apoptosis, así como las posibles mutaciones que modifican la vía y por ende, la respuesta en el organismo ante diversos estímulos ⁽²⁵⁾.

3.9.1 Apoptosis, inducida o inhibida por microorganismos

Desde el momento en que el equipo del Dr. Kerr catalogó a este fenómeno celular, como un mecanismo capaz de regular las poblaciones celulares animales, se vislumbró también la opción de que pudiera ser modulado por una gran variedad de estímulos ambientales, fisiológicos y patológicos ⁽¹³⁾. A pesar de lo prematuro de la idea, con el pasar del tiempo y el avance en las investigaciones, se ha podido determinar que la apoptosis es un mecanismo íntimamente relacionado con los procesos de salud y enfermedad en el organismo ^(3, 22).

En la década de los años 80's, los trabajos del Dr. Brenner, demostraron que la apoptosis, además de ser un proceso genéticamente controlado y por tanto, altamente preservado en la evolución; era susceptible a presentar fallas, debido a mutaciones en los genes moduladores hasta ese momento conocidos, este conocimiento se logró mediante la generación de modelos *knockout* en larvas de *C. elegans* ⁽¹⁴⁾.

Ya en la década de los 90's, los trabajos sobre apoptosis, contemplaban también su interacción con diversos microorganismos, entre ellos el virus del SIDA ⁽²²⁾, mencionando que existía un mecanismo que disparaba la muerte celular de los CD4+, y la depresión inmune consecuente que caracteriza a la infección por este virus.

El fenómeno de apoptosis, y su modulación por agentes infecciosos aún no está del todo definido, se sabe que en el caso de bacterias Gram negativas, la presencia del LPS juega un papel muy importante en la interacción con el hospedero y su sistema de defensa; con respecto a *Brucella*, los estudios se han centrado en la identificación de factores que afectan el tráfico intracelular y la multiplicación de la bacteria en el interior de células fagocíticas y no fagocíticas, lo que le permite multiplicarse e invadir a nuevas células; hasta el momento, no se han descrito factores de virulencia clásicos como exotoxinas, plásmidos, citolisinas, cápsula, fimbria, flagelos, fagos lisogénicos, formas resistentes, variación antigénica, lipopolisacárido endotóxico o inductores de apoptosis; sin

embargo, recientemente se ha identificado un sistema de secreción de tipo IV (VirB) y se sabe que su presencia es esencial para la supervivencia y la multiplicación intracelular, ya que controla la maduración del fagosoma ⁽²⁶⁾

Otro eje estudiado en *Brucella*, es el polisacárido O (perosamina), que además de servir como referencia taxonómica obligada, también protege a la bacteria del fagolisosoma e inhibe la apoptosis de la célula hospedadora ^(27, 28)

3.10 Técnicas empleadas en la detección de apoptosis

El proceso de apoptosis es complejo, y por tanto, la metodología usada para su identificación, debe ser cuidadosa; ninguno de los métodos existentes, cuando se usa individualmente es capaz de proporcionar exactitud en la detección de todas y cada una de las fases de la apoptosis. En 2007, Elmore, realizó una clasificación para los métodos de detección de apoptosis, todos los métodos enlistados, presentan ventajas y desventajas, de índole técnico-científico así como costo-beneficio, esto en función del objetivo de medición que se tenga propuesto ^(21, 22).

Tabla 1. Clasificación de Elmore para el estudio comparativo de la apoptosis. Modificado de Martínez, 2009 ⁽²¹⁾.

CATEGORÍA	TÉCNICAS MÁS UTILIZADAS
Alteraciones citomorfológicas.	Microscopia: HE, NA, DAPI, Tunel.
Fragmentación del ADN.	Electroforesis en gel de agarosa.
Detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores.	Western blot, Inmunoprecipitación e Inmunohistoquímica.
Alteraciones de membrana.	Anexina V conjugada.
Ensayos mitocondriales.	Citometría de flujo con: Rodamina

3.10.1 Microscopia

La realización de cortes histológicos y su posterior tinción con HE, y algunas otras tinciones, permite evaluar si está presente o no el fenómeno, sin embargo no es una evaluación definitiva debido a que solo es factible observar la fase “de burbujeo” de las células en apoptosis, por lo tanto se usa como una tinción

cuantitativa, además de ser útil en el diagnóstico de lesiones necróticas que eventualmente podrían darnos falsos positivos en posteriores tinciones, el HE resulta ser una técnica sumamente rápida y económica ⁽²¹⁾.

3.10.2 Naranja de Acridina

Es un colorante vital de tejidos y ácidos nucleicos ⁽²⁹⁾. Esta técnica originalmente se diseñó para observar bacterias en muestras de suelos, hoy en día es muy aplicada en el laboratorio de microbiología para detectar bacterias en frotis de líquidos y exudados ⁽³⁰⁾. Podríamos considerarla de tipo cualitativo, ya que al teñir el DNA expuesto, ya sea por mitosis, necrosis o apoptosis puede generarnos falsos positivos.

3.10.3 Electroforesis del DNA

Es un método cualitativo, evidencia la fragmentación de la cromatina, permitiendo así la visualización del patrón de escalera, mientras que en el caso de la necrosis, la misma prueba demuestra un patrón de barrido. El material genético obtenido de la extracción, a partir de tejidos, cultivo celular o cultivos bacterianos, deberá ser colocado en un gel de agarosa con densidad de 1% a 2% y se tiñe con bromuro de etidio. Una desventaja de esta técnica es que para poder visualizar el patrón de escalera, característico de la apoptosis, se necesita cerca de un millón de células en apoptosis por cm^2 ; cuando la cantidad de apoptosis en el tejido a estudiar, es menor a esto, el material genético extraído, es visible en el gel, pero no con el patrón de escalera ^(3, 21).

3.10.4 Inmunohistoquímica

La detección de moléculas que actúan desde los primeros momentos del fenómeno, ha resultado de gran utilidad; ya que representa la posibilidad de evaluar la presencia de productos y subproductos bioquímicos, que han demostrado estar altamente correlacionados con la señal de inducción de apoptosis, por tanto, se puede considerar como un método confiable; para esta técnica, se emplean diversos anticuerpos específicos que identificarán proteínas

presentes en el proceso de apoptosis, un ejemplo de estos marcadores son: FAS (CD95), FaSL (CD95L), caspasas, y p53 ^(1, 31).

Otro ensayo en la detección de cambios primarios del proceso de apoptosis, es el que se realiza con el conjugado de Anexina V. El fundamento de esta técnica es que uno de los cambios más tempranos, es la pérdida de simetría en la membrana citoplasmática, lo cual permite que la fosfatidilserina que originalmente se encuentra orientada hacia el espacio intermembranal, sea expuesta y por tanto, pueda ser marcada por la Anexina V ^(21, 31, 32).

3.10.5 TUNEL

La degradación de material genético que realizan las endonucleasas, genera fragmentos 3'OH libres; lo que permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el DNA. La reacción se cataliza, *in situ*, mediante la acción de una transferasa terminal. Esta enzima incorpora deoxiuridina modificada con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. Posteriormente, los nucleótidos modificados se detectan tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo como molécula trazadora. El nucleótido incorporado puede estar directamente marcado con el fluorocromo ⁽³²⁾. La desventaja de esta técnica, además del costo elevado, es la posibilidad de falsos positivos con necrosis ^(3, 21).

3.10.6 Citofluorimetría (citometría de flujo)

Esta técnica contempla tres apartados:

- a) Detección de moléculas. Se utilizan anticuerpos acoplados a algún fluorocromo, que reconocen y marcan a alguna de las moléculas involucradas en el proceso: Fas (CD95), FaL (CD95L), Bcl-2 y p53.
- b) Análisis del ciclo celular. Utiliza fluorocromos (PI, DAPI, NARANJA DE ACRIDINA) que se intercalan de manera estequiométrica en el DNA, de esta manera es posible cuantificar el material genético presente en cada

célula, y así determinar la fase del ciclo celular en la que se encuentran. La desventaja de esta técnica, es que identifica fases muy tardías de la apoptosis, tomando en cuenta que la ventana de observación de este proceso es de aproximadamente dos horas, esta técnica es inapropiada para evaluar sistemas *in vivo*.

- c) Determinación de la activación de caspasas. Emplea los sustratos correspondientes a la enzima que se desea identificar, añadiendo moléculas fluorogénicas, cuando la enzima esta activa, actúa sobre el sustrato correspondiente, liberando así a la molécula flurogénica y haciéndola evidente en el citofluorómetro.

Capítulo IV.

JUSTIFICACIÓN

El proceso de apoptosis en los tejidos tiene implicaciones de regulación y homeostasis, dado que no se conoce la dinámica del proceso en el tracto reproductor del macho ovino clínicamente sano, se considera importante caracterizar y cuantificar la apoptosis en los distintos órganos y las poblaciones celulares, sus posibles efectos y orígenes, así como su papel en los procesos de salud-enfermedad del tracto reproductor del macho.

Capítulo V.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Conocer la ocurrencia de apoptosis en tejidos del tracto reproductor de machos ovinos clínicamente sanos, estresados e infectados con *B. ovis*, obtenidos en rastro.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evidenciar la apoptosis mediante la técnica de hematoxilina-eosina en los tejidos sanos del tracto reproductor de machos ovinos.
- ❖ Cuantificar la apoptosis con el colorante naranja de acridina y la técnica de TUNEL en el tracto reproductor de machos ovinos.

Capítulo VI.

HIPOTESIS

La presencia de figuras sugerentes de apoptosis en el tracto reproductor del carnero puede modificarse según la condición funcional y de salud del mismo.

Capítulo VII.

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se realizaron visitas periódicas al rastro, y se obtuvieron sangre y los tractos reproductores completos de carneros. El primer grupo se conformó de 25 machos clínicamente sanos, entre 18 y 24 meses de edad, se realizaron pruebas de IDD, y se emplearon las muestras seronegativas a *B. ovis*; el segundo grupo, 10 carneros sometidos a estrés por dominancia (recuperados de grupos experimentales) seronegativos por IDD a *B. ovis* y el tercer grupo, 8 carneros positivos por IDD a *B. ovis* y con lesiones características de epididimitis, provenientes de Fundación Zacatecas Produce.

7.2 Diagnóstico serológico

Inmediatamente después del sacrificio se recolectó sangre completa para obtención de suero. El procedimiento de diagnóstico se realizó de acuerdo a la NOM-041 Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales; mediante Inmunodifusión doble en gel de agarosa, con antígeno específico de *B. ovis* ⁽³³⁾.

7.3 Lectura de laminillas

Se evaluaron las laminillas obtenidas primero con la tinción de Hematoxilina-eosina (HE), y aquellos órganos que presentaron imágenes sugerentes de apoptosis, fueron después teñidos con Naranja de acridina (NA).

La imagen característica de apoptosis en HE es la condensación citoplasmática, disminución del volumen celular y evaginación de la membrana celular; esto se traduce en estructuras vesiculares que contienen material citoplasmático y organelos (cuerpos apoptóticos). En la tinción de NA se contabilizaron de forma aleatoria 10 campos no confluentes de cada órgano, tomándose en cuenta como criterios positivos sugerentes de apoptosis, la disminución del volumen celular y la fluorescencia.

Se realizó la tinción de TUNEL solamente en aquellos órganos positivos a la tinción de NA. Para la lectura de esta última tinción, los criterios de positividad fueron también la presencia de marca fluorescente de cuerpos apoptóticos y la disminución del volumen celular.

La evaluación de las laminillas con tinción de HE, se realizó en microscopio óptico; mientras que la tinción de NA y TUNEL, fue evaluada en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, cámara Evolution VF Cooled color MediaCybernetics y el programa Qcapture Pro version 6.0.

Capítulo VIII.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados serológicos por IDD obtenidos para cada grupo.

Tabla 2. Resultados serológicos obtenidos para cada grupo experimental.

	Macho	IDD
Grupo 1 seronegativos por IDD a <i>B. ovis</i>	Macho 1	Negativo
	Macho 2	Negativo
	Macho 3	Negativo
	Macho 4	Negativo
Grupo 2 estresados y seronegativos por IDD a <i>B. ovis</i>	Macho 1	Negativo
	Macho 2	Negativo
	Macho 3	Negativo
	Macho 4	Negativo
	Macho 5	Negativo
	Macho 6	Negativo
Grupo 3 seropositivos por IDD a <i>B. ovis</i>	Macho 1	Positivo
	Macho 2	Positivo
	Macho 3	Positivo
	Macho 4	Positivo
	Macho 5	Positivo

Una vez que la serología fue comprobada y se verificó que los órganos recolectados estuvieran completos, se conformaron los grupos correspondientes y se comenzó la elaboración de laminillas con tinción de HE, posteriormente se realizó NA y por último TUNEL.

Cada una de las tinciones realizadas fue usada como criterio de exclusión para la siguiente, de tal suerte que el número de animales en cada grupo fue disminuyendo, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Muestra la exclusión de machos en cada grupo, a lo largo del proyecto.

Grupo experimental	HE	NA	TUNEL
Grupo 1	25	4	2
Grupo 2	10	6	2
Grupo 3	8	5	2

Se realizó el conteo (Tablas 4 y 5) y el promedio de células en apoptosis (Tabla 5) en al menos 10 campos no confluentes en cada órgano. Los datos se analizaron con el programa Statgraphics multiplex.

La revisión de laminillas con tinción de HE fue usada como primer criterio de exclusión para evaluar la normalidad de los tejidos. En las Figuras 4 y 5 se muestran fotografías obtenidas con la tinción de HE, en donde encontramos las imágenes sugerentes de apoptosis, se podrá apreciar la “fase de burbujeo” que corresponde a la inclusión de los organelos celulares, en lo que se conoce como cuerpos apoptóticos ⁽⁸⁾.

La Tabla 4, resume los promedios de conteos de figuras sugerentes de apoptosis con la tinción de NA en los diferentes órganos analizados, mientras que en las Figuras 6 y 7 se observan imágenes de la tinción de NA con células que sugerían estar en apoptosis, es decir, aquellas que mostraron disminución del volumen celular y fluorescencia.

En las Figuras 8 y 9 se aprecian las fotografías obtenidas con la tinción de TUNEL, misma que es confirmatoria de la presencia de apoptosis, nuevamente tomando como referencia la fluorescencia de los cuerpos apoptóticos y la disminución del volumen celular. En la Tabla 5 se resumen los hallazgos con TUNEL, en las dos últimas tinciones el mayor número de células sugerentes de apoptosis se presentó en vesícula seminal y uretra, pero los resultados no tuvieron significancia estadística ($P= 0.28$)

Tabla 4. Promedios de figuras apoptóticas en la tinción con NA en los diferentes órganos analizados de cada grupo.

Grupo experimental	Macho	Vesícula seminal	Ámpula	Uretra	Testículo	Epidídimo	Próstata	Vejiga
Grupo 1	1	1	0	0	0	0	0	0
	2	13	0	0	0	0	0	0
	3	14	7	3	0	0	0	0
	4	2	2	2	0	0	0	0
Grupo 2	1	0	0	0	0	1	0	0
	2	1	3	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	7	0	0
	5	1	0	0	0	0	0	1
Grupo 3	1	0	0	0	0	2	0	0
	2	3	0	0	0	0	0	0
	3	5	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	2	0	0	0	0	0

Tabla 5. Promedios de figuras apoptóticas en la tinción de TUNEL.

Grupo experimental	Macho	Vesícula seminal	Ámpula	Uretra	Testículo	Epidídimo	Próstata	Vejiga
Grupo 1	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	3	0	0	0	0	0	0
Grupo 2	1	0	0	1	0	0	0	0
	2	0	1	3	0	1	0	0
Grupo 3	1	2	0	3	0	1	0	0
	2	0	0	0	0	0	1	0

Gráfica 1. Muestra el número de células en apoptosis observadas por órgano y grupo, con la técnica de TUNEL.

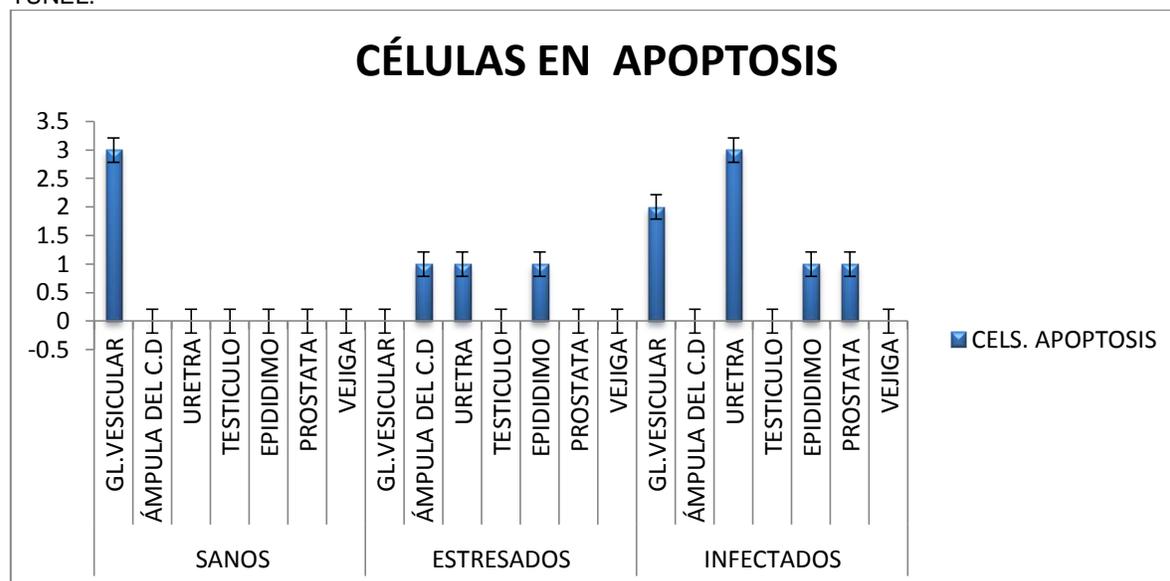


Tabla 6. Muestra el promedio y la desviación estándar entre grupos, con respecto a la Gl. Vesicular.

Grupos	Órgano	Promedio y DS	
Clínicamente sanos	Gl. Vesicular	7.5	2.64
Estresados	Gl. Vesicular	0.33	0.72
Naturalmente infectados	Gl. Vesicular	1.6	1.52

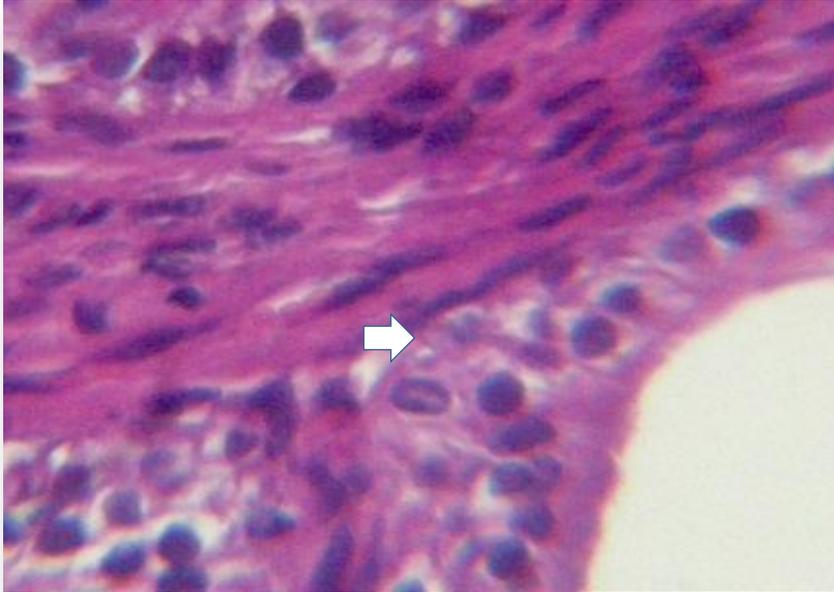


Figura. 4. Tinción HE (400x). Epidídimo con imagen sugerente de apoptosis (flecha).

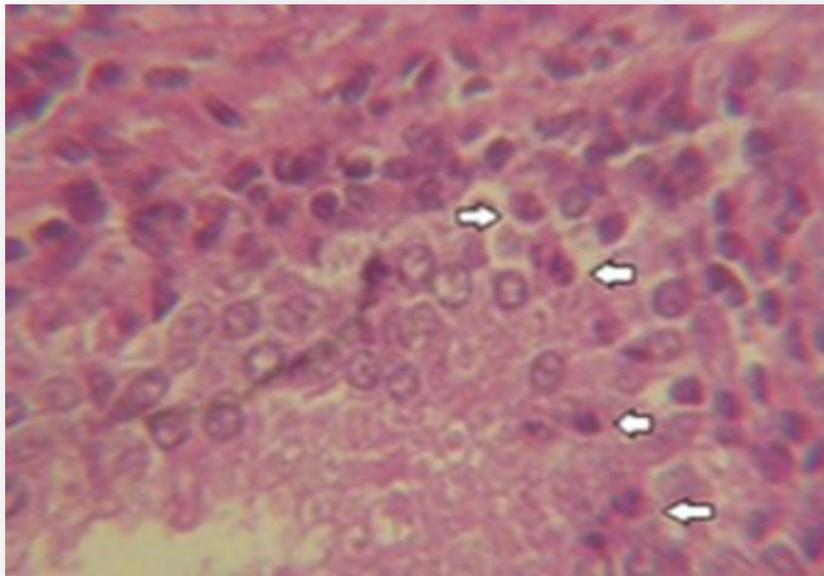


Fig. 5. Tinción HE (400x). Se muestran figuras apoptóticas (flecha) en glándula vesicular de carnero naturalmente infectado.

Una vez comprobada la ausencia de focos necróticos, infiltrados celulares, y la presencia de puntos sugerentes de apoptosis, se realizó la tinción de NA.

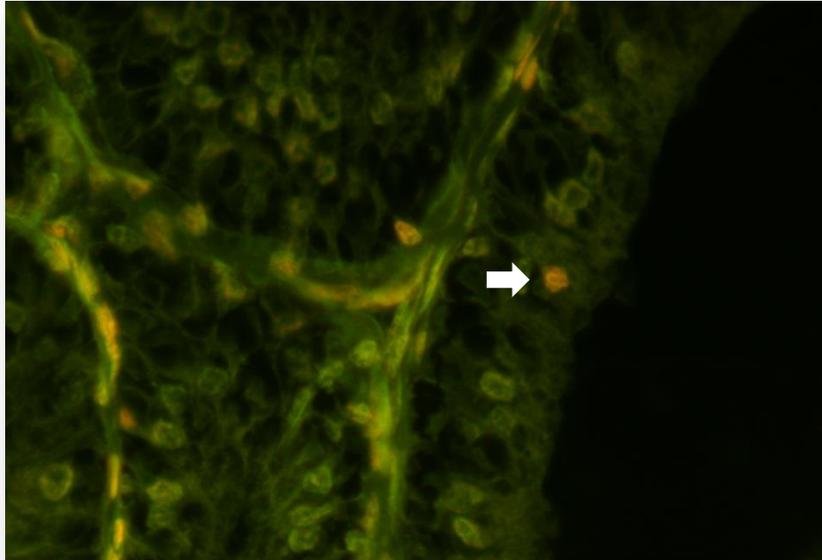


Figura 6. Glándula vesicular (NA) (400x), imagen sugerente de apoptosis (flecha).

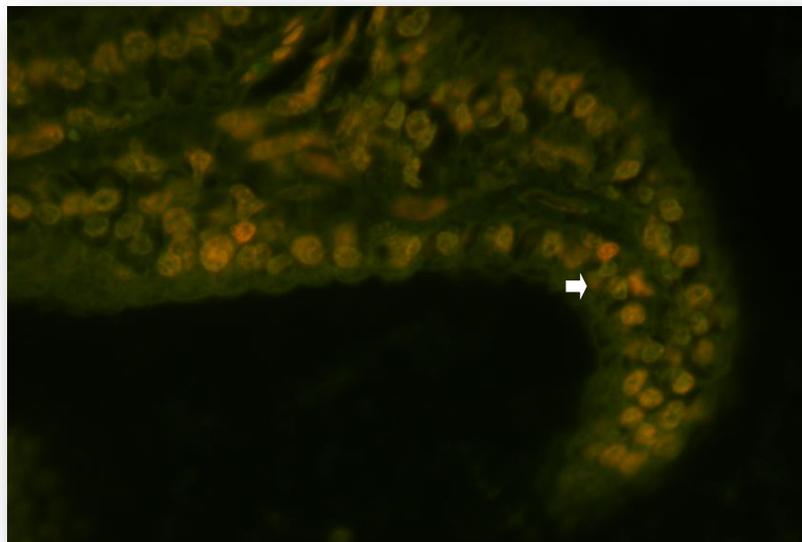


Figura 7. Ámpula del conducto deferente (NA) (400x). Imagen sugerente de apoptosis (flecha).

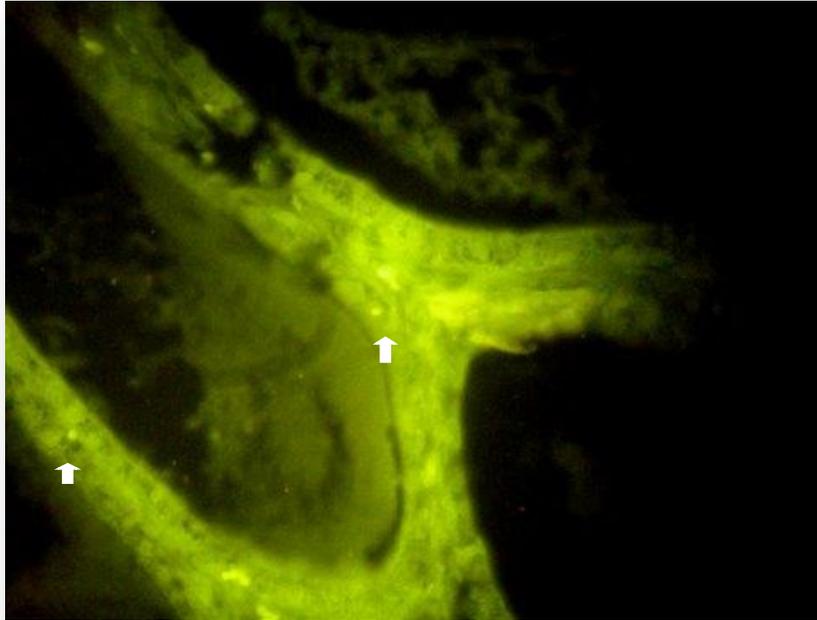


Figura 8. Tinción de TUNEL (400x), se muestra la glándula vesicular con marca positiva de apoptosis (flechas).

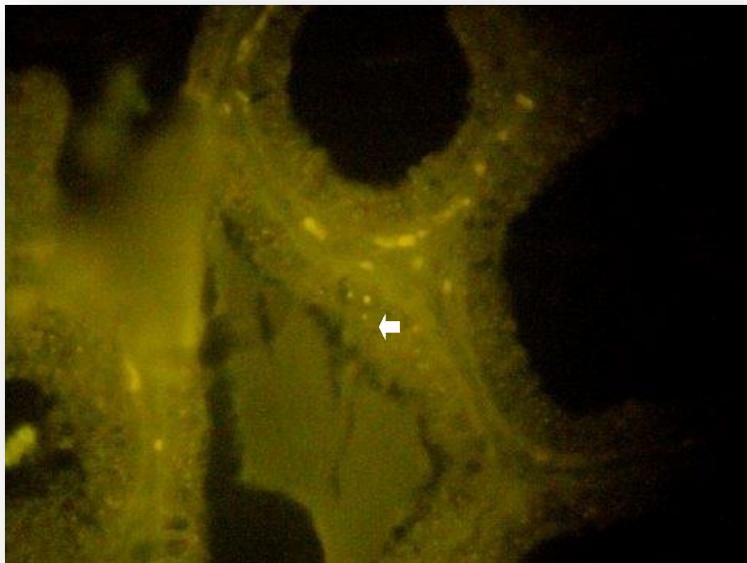


Figura 9. Tinción de TUNEL (400x). Epidídimo con marca positiva (flecha).

Capítulo IX.

DISCUSIÓN

El órgano con mayor cantidad de figuras de apoptosis, fue la vesícula seminal, mientras el resto de órganos muestran apenas una marca positiva en TUNEL la vesícula seminal tiene hasta 3 marcas, sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (P es de 0.28), quizás por la dispersión de resultados obtenidos. Las imágenes de apoptosis se observaron fundamentalmente en los epitelios glandulares y pueden corresponder a células epiteliales o a células de respuesta inmune en migración transepitelial. Sin embargo los conteos no se modificaron ni con la condición de estrés que moviliza neutrófilos al semen, ni con la infección natural con *B. ovis*. (Tabla 4); a diferencia de como ocurre en machos cabríos, que habiendo estrés, éste se traduce en un aumento de los niveles de cortisol, leucoespermia y en algunos casos modificaciones en la dinámica leucocitaria en sangre ⁽³⁴⁾. Estudios recientes han demostrado que en el particular caso de los ovinos, se observa infiltración y migración de neutrófilos a través de uretra, ampulla y vesícula seminal; además de leucoespermia en animales clínica, serológica e histológicamente sanos; resultados que proponen no interpretarse como hallazgo de infecciones en el tracto reproductor de machos ovinos ⁽³⁵⁾

Otros ensayos ⁽¹³⁾ mencionan que la apoptosis, al ser un proceso totalmente fisiológico, es susceptible a tener “fallas” y por tanto, está involucrado en el desarrollo de enfermedades. En las condiciones del tracto masculino, la barrera hemato-testicular relacionada a los epitelios, determina que la presencia de cuadros inflamatorios que dañen esta barrera eventualmente genere respuestas de carácter autoinmune.

Capítulo X.

CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias significativas en los conteos de células en apoptosis entre órganos, poblaciones celulares o grupos. Sugiriendo que la ocurrencia de apoptosis en el tracto reproductor del carnero no sería modulada por factores de estrés o la infección crónica por *B. ovis*.

Los resultados aquí presentados son parciales, pues La información recabada, aún deben ser contrastada con carneros desafiados con *B. ovis* y que a lo largo de la infección, fueran sometidos a estrés.

ANEXOS

Procesamiento Histológico

Del tracto reproductor, se obtuvo una muestra de cada órgano, ámpulas del conducto deferente, vesículas seminales, glándula bulbouretral, próstata diseminada, uretra pélvica, pene y prepucio, que se fijaron por inmersión en formalina amortiguada durante 24h a 4°C.

Las muestras fueron procesadas por el método de inclusión en parafina de rutina (Brancroft, 1990), se obtuvieron cortes de 4µm de espesor, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y naranja de acridina (NA) (Martins y col., 2007). Las células con morfología sugerente de apoptosis se identificaron en la tinción de TUNEL.

Tinción Hematoxilina Eosina

Las laminillas obtenidas fueron teñidas con la técnica de rutina de Hematoxilina Eosina.

Principio.

Coloración bicrómica que usa una hematoxilina como colorante básico, para las estructuras ácidas y una eosina como colorante ácido para las estructuras básicas.

Fijación.

Cualquier buen fijador.

Procedimiento.

Desparafinar e hidratar

Teñir con hematoxilina de Harris 3 minutos

Lavar con agua corriente, 15 minutos

Diferenciar en alcohol ácido o/y carbonato de litio, 5 minutos

Lavar en agua corriente, hasta que vire a color azul

Enjuagar con agua destilada

Teñir con eosina Carnegy, 10 minutos

Deshidratar en etanol al 96 %, en dos pasos

Deshidratar en etanol absoluto, en dos pasos, 5 minutos cada uno

Aclarar con xileno, en dos pasos, 5 minutos cada uno

Cubrir con medio de montaje sintético.

Resultados

Núcleos: negro - azul

Citoplasma: tonos de rosa y naranja.

La colección de laminillas teñidas con esta técnica, fue observada al microscopio, y basándose en su imagen e interpretación histológica, se realizó la selección para la tinción de Naranja de Acridina.

Tinción Naranja de Acridina

Fijación.

Cualquier buen fijador.

Procedimiento.

Desparafinar e hidratar

Teñir con Naranja de Acridina 20 minutos

Lavar con agua destilada

Deshidratar en etanol al 96 %, en dos pasos

Deshidratar en etanol absoluto, en dos pasos, 5 minutos cada uno

Aclarar con xileno, en dos pasos, 5 minutos cada uno

Cubrir con medio de montaje sintético.

Resultados

Núcleos activos muestran fluorescencia.

TUNEL

Para evidenciar la fragmentación del DNA se utilizó el Kit para TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, con fluoresceína, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Incubar durante 20 minutos a 60°

Desparafinar toda la noche en xileno

Desparafinar 10 minutos en xileno

Deshidratar en etanol (100°, 96°, 70°) 5 minutos en cada uno

Lavar en agua destilada 5 minutos

Amortiguar con citrato de sodio 0.1 molar pH6 (dar 3 pulsos de 30 segundos cada uno, con intervalos de 1 minuto, en microondas potencia media, y luego dejar reposar por 10 minutos)

Permeabilizar con PBS Tritón 1 hora a 37°

Lavar con PBS-T

Lavar con PBS

Agregar la mezcla de TUNEL + cloruro de magnesio 50 mM (9:1) y agregar 33 μ l de enzima, incubar a 4° toda la noche

Lavar con PBS

Cubrir con glicerogel y conservar a 4°.

En el control negativo no se agrega la mezcla de TUNEL y en el control positivo se agrega solamente DNAsa I. Se contarán al menos 100 estructuras de cada muestra, el porcentaje final con fragmentación del DNA será referido como % de TUNEL positivo.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación esquemática que señala diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis. Tomado de Lizalbé, 2007.	3
Figura 2. Tracto reproductor de carnero, vista lateral. Tomado de Bearden & Fuquay. 1982.	6
Figura 3. Esquema de las dos vías de señalización de apoptosis. Tomado de Mitchell, 2007	12
Figura 4. Tinción HE. Se muestra la glándula vesicular con imagen sugerente de apoptosis (flecha).	30
Figura 5. Tinción HE. Glándula vesicular con imagen sugerente de apoptosis (flechas).	30
Figura 6. Glándula vesicular (NA), muestra imagen sugerente de apoptosis (flecha).	31
Figura 7. Imagen sugerente de apoptosis (flecha) en ámpula del conducto deferente (NA).	31
Figura 8. Tinción de TUNEL, se muestra la glándula vesicular con marca positiva de apoptosis (flechas).	32
Figura 9. Epidídimo tinción de TUNEL con marca positiva (flecha).	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Elmore para el estudio comparativo de la apoptosis. Martínez, 2009.	17
Tabla 2. Resultados serológicos obtenidos para cada grupo experimental.	26
Tabla 3. Muestra la exclusión de machos en cada grupo, a lo largo del proyecto.	26
Tabla 4. Muestra los conteos de figuras apoptóticas obtenidas en los diferentes órganos analizados de cada grupo. (NA).	28
Tabla 5. Muestra los conteos obtenidos en la tinción de TUNEL.	28
Tabla 6. Muestra el promedio y la desviación estándar entre grupos, con respecto a la Gl. Vesicular.	29

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Muestra el número de células en apoptosis observadas por órgano y grupo, con la técnica de TUNEL.	29
---	-----------

ABREVIATURAS

HE	Hematoxilina Eosina
NA	Naranja de Acridina
TUNEL	Terminal dUTP Nick End Labeling /Marcado del extreme libre por dUTP (desoxi-transferasa terminal)
SRY	Sex-determining region Y
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
TDF	Factor determinante testicular
MIF	Factor inhibidor mülleriano
DHT	Dihidrotestosterona
TNF	Factor de necrosis tumoral
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bax	BCL2-associated X protein
bak	BCL2- antagonist / Killer
Smac/Diablo	Second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP Binding proteins with low PI
IAPs	Inhibithors of apoptosis proteins / Proteínas Inhibidoras de Apoptosis
FLIP	FLICE (caspasa 8) – inhibitory proteins
Bcl-X_L	B-cell lymphoma – extra large
Bad	BCL2-associated agonist of cell death
BID	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Fas	Fatty acid synthetase (miembro de la superfamilia de TNF)
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
DAPI	Diamino phenylindole
IDD	Inmuno difusión doble

BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez-Torres LE, Diosdado VF. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc Pec. Méx* 2003; 41:49-62.
2. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Introducción a la Biología Celular y Molecular*. 2ª.ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2006. 18: 612 – 632. 21: 726 – 736.
3. Flores-Pérez FI. ¿Es la muerte importante para la vida? *Vet. Mex.* 2002. 33: 161-172.
4. Zúñiga E, Acosta RE, Montes C. Gruppi A. Apoptosis de linfocitos asociado a enfermedades infecciosas. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 62: 189-196.
5. Bolsover SR, Hyams JS, Shepard EA. *Biología celular*. Traducción por Néstor Santiago Gonzalvo. Editorial Acribia. España, 2004. 19. 381-400.
6. Flores-Pérez FI, Rosas-Velasco C, Romano PMC, Pérez-Martínez M. Apoptosis y atresia folicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Vet. Méx.* 2005. 36: 87-103.
7. Duke RC, Ojcius DM, Ding-E YJ. Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad. *Investigación y ciencia*, febrero, 1997. 44-52.
8. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Compendio de Robbins y Cotran Patología estructural y funcional*. 7ª. ed. Elsevier. España, 2007. 1:15-19.
9. Lizalbé IMA. El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)*. Vol. 101. N°. 2. 2007. 1-33.
10. Ruibal-Ares B, Belmonte I, Baré P, De Elizalde BMM. Apoptosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60 (Supl II): 17-20.
11. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B. *Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales*. Interamericana-McGraw-Hill. MADRID, 1996. I: 13-14.
12. Jordan J. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*. Vol. 22 NÚM 6 Junio 2003. 100-106.
13. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *BrJ Cáncer* 1972; 26:239.

14. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, *et al.* Biología Celular y Molecular. 5^a.ed. Traducción por Andrea Méndez, Silvia Rodríguez y Octavio Giovanniello. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2005. 22. 23.
15. Banks JW. Histología Veterinaria Aplicada. Traducción por Luis Ocampo Camberos y Ana Ma. Auró Angulo. Editorial Manual Moderno. México, 1986. 23: 606-628.
16. Bearden H, Fuquay J. Reproducción animal aplicada. Manual Moderno, México, 1982.
17. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología Texto y Atlas en Color con Biología Celular y Molecular. 4^a.ed. Traducción por Jorge Horacio Negrete. Editorial Médica Panamericana. Argentina, 2005. 21: 685-714.
18. Márquez YC., Páramo RRM. Galina C, Valencia J; compiladores. Reproducción de los animales domésticos. 2^a.ed. Limusa. México, 2006. 1: 11-25. 2:27-42.
19. Cerveny C. CKöning AE, Liebich HG, Maierl J. anatomía de los animales domésticos texto y atlas en color. 2^a.ed. traducción por Jorge E.B. Ostrowsky. Editorial Médica Panamericana. Madrid, 2002. 10: 119-135.
20. Hafez SEE, Hafez B. reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7^a.ed. Traducción por Guillermina Féher de la Torre y Elia Olvera Martínez. McGraw-Hill Interamericana. México, 2002. 1: 3-11.
21. Martínez SM. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No. 2 Diciembre 2009; 152-166.
22. Rodríguez L, Reyes-Esparza JA. Apoptosis: características generales y sus implicaciones en procesos fisiopatológicos. Biotecnología Aplicada. Vol. 12. 1: 1-8 (1995).
23. Jiménez GLF, Merchant LH. Biología celular y molecular. Person Educación. México, 2003. 20: 617-654.
24. Cooper MG, Hausman ER. The cell a molecular Approach. 4^a ed. Sinaver Associates, Inc. USA, 2007. 13: 579-587.

25. López-Martínez M, Azola M, Cuevas N, Aguirre MJ, Martínez DP. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC). *Medicina Oral*. 2002; 7:108-20. ISSN 1137-2834.
26. Posadas MD. Transporte y adhesión en *Brucella suis*: rol de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador. (Tesis Doctoral) Argentina. Universidad de Buenos Aires, 2000. 14-16
27. Caroff M., Brundie D.R., Perry M.B., Cherwonogradsky, J.W. and Duncan, J.R. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.* 1984; 46:384-389.
28. Fernández-Prada C. M. *et al.* Interactions between *Brucella mellitensis* and human phagocytes bacterial surface O- Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect. Immun.* 71, 2110-9 (2003).
29. Garrido FGI, Cornejo CMA, Salinas JE. Manual de colorantes para Laboratorios de ciencias básicas. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2003. X : 68.
30. Albarado Y, Luzmila y Flores FE. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas spp* aisladas de suelo. *Kamera* 36 (1) : 17 – 27; 2008.
31. Alfaro ME, García CC, Dueñas GA. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. Vol.46, Núm. 4 Octubre-Diciembre 2000: 275-280.
32. Roche Applied Science. Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation. 4^a.ed. 2008.
33. Méndez NG, Díaz AE, Morales AJF, Aguilar RF, Suárez GF. Epididimitis ovina: Estudios bacteriológico y serológico. *Vet. Mex.*, 30(4) 1999.

34. Ortíz de Montellano N, A.M. Evaluación de las interacciones sociales en el macho cabrío y su efecto sobre la secreción hormonal y la calidad espermática. Tesis Doctor en Ciencias Agropecuarias, Fac. de MVZ, UAY 2004.
35. Castillo HG, Garrido FGI, Martínez PDI, Gutiérrez HJL, Tórtora PJL. Leucocitospermia en machos ovinos normales. Memorias ALEPRyCS, 2011. 421-424.