



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y WESTERN BLOT PARA EVALUAR
PRESENCIA Y ASOCIACIÓN DE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA EN LA
REGRESIÓN DEL PARÉNQUIMA TESTICULAR DE GALLOS
REPRODUCTORES PESADOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

TANIA MARILYN SOTO GUILLÉN

Asesores:

Asesor: MVZ. M. en C. Socorro Magdalena Escorcia Martínez

Coasesor: M. en C. Omar Noel Medina Campos



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi Dios por iluminar y guiar siempre mi camino.

A mis padres: Sonia y Juan por siempre estar.

A mis abuelos: Minerva y Rodolfo por la aventura con los gallos.

A mis profesores: Magdalena Escorcia y Néstor Ledesma por enseñarme el camino hacia lo que es mi pasión.

A los profesores del C.E.I.E.P.Av. por recibirme en mi servicio social y fortalecer mi cariño por esta área.

A mis seres queridos: César, Raúl, Lalo, Gaby, Sharon, Diana, Romina, Jessica, Alison y Belem por su ánimo y apoyo.

A la vida por brindarme la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera.

Y a cada una de las personas que me brindaron su apoyo en mi formación profesional.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó con el soporte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN211918

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme una de las mejores etapas de mi vida.

A mi asesora la Doctora Magdalena Escorcía Martínez por ser mi guía durante todos estos años, por el apoyo y la confianza para desarrollar este proyecto.

A mi asesor el Doctor Omar Noel Medina Campos por enseñarme muchas cosas nuevas, brindarme paciencia y amabilidad.

Al Doctor David Ramos Vidales por todo el apoyo con la parte estadística del proyecto.

A la Doctora Mireya Juárez Ramírez por todo el apoyo desde el inicio del proyecto hasta el final.

Al Doctor José Pedraza Chaverri por el apoyo incondicional para desarrollar este proyecto en su laboratorio.

A la empresa Cobb por medio del Doctor Guadalupe Pardo González por todo el apoyo durante el proyecto.

Al maestro Alfredo Briones Herrera por todo el apoyo para poder realizar el Western blot.

Al señor Miguel Ángel Martínez Ramírez por toda la paciencia y apoyo para realizar la Inmunohistoquímica.

Al señor Alfredo Amadeo Díaz Estrada por su apoyo con los cortes histológicos para la Inmunohistoquímica.

A mis sinodales por las observaciones y pláticas para mejorar en el ámbito personal y profesional para que este proyecto pudiera realizarse.

CONTENIDO

Resumen

1.INTRODUCCIÓN	2
1.1 Importancia del gallo reproductor.....	2
1.2 Anatomía y fisiología del testículo.....	2
1.3 Espermatogénesis.....	5
1.4 Regresión testicular.....	6
1.5 Apoptosis.....	7
1.6 Autofagia.....	9
1.7 Interacción entre apoptosis y autofagia.....	10
1.8 Técnicas de laboratorio para la identificación de proteínas.....	10
1.8.1 Western blot.....	10
1.8.2 Control de carga.....	11
1.8.3 Inmunohistoquímica.....	11
1.9 Impacto económico.....	11
1.10 HIPÓTESIS	12
1.11 OBJETIVOS	12
1.11.1 General.....	12
1.11.2 Específicos.....	12
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	13
2.1 Reactivos.....	13
2.2 Población objetivo.....	14
2.3 Manejo de los testículos.....	14
2.4 Extracción de proteínas.....	15
2.5 Cuantificación de proteínas.....	15
2.6 Western blot.....	15
2.7 Inmunohistoquímica.....	17
2.8 Análisis estadístico.....	20
3.-RESULTADOS	22
3.1 Apoptosis (Western blot).....	22

3.2 Autofagia (Western blot).....	23
3.3 Asociación de apoptosis y autofagia	27
3.4 Apoptosis (Inmunohistoquímica).....	28
3.4.4 Autofagia (Inmunohistoquímica).....	29
4.- DISCUSIÓN	30
5.- CONCLUSIÓN	33
6.- PERSPECTIVA	33
7.- BIBLIOGRAFÍA	33
8.- ANEXOS	39
8.1 Anexo A Soluciones empleadas.....	38
8.2 Anexo B Análisis estadístico.....	38
8.3 Anexo C Protocolo Inmunohistoquímica caspasa-3.....	39
8.4 Anexo D Modificaciones al protocolo de LC3.....	41
8.5 Anexo E Requerimientos nutricionales del macho Cobb 500.....	42
8.6 Anexo F Pesos estándar macho Cobb 500.....	42

Índice de fotos

Foto 1. Testículos de gallo.....	3
Foto 2. Western blot de muestras de testículos de gallos, caspasa 3.....	22
Foto 3. Western blot de muestras de testículos de gallos, LC3-I.....	23
Foto 4. Western blot de muestras de testículos de gallos, LC3-II.....	25
Foto 5. Inmunohistoquímica caspasa 3.....	29

Índice de gráficos

Gráfica 1. Cuantificación de la expresión de la proteína caspasa-3	22
Gráfica 2. Evaluación estadística mediante Spearman para caspasa-3 y edad....	23
Gráfica 3. Cuantificación de la expresión de la proteína LC3-I.....	24
Gráfica 4. Evaluación estadística mediante Spearman para LC3-I y edad.....	24
Gráfica 5. Cuantificación de la expresión de la proteína LC3-II.....	25
Gráfica 6. Evaluación estadística mediante Spearman para LC3-II y edad.....	26
Gráfica 7. Correlación entre apoptosis y autofagia	27

Gráfica 8. Evaluación estadística mediante Spearman para conteos de células con inmunopositividad y edad.....28

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Descripción de la abreviatura
ASB	Albúmina Sérica Bovina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBS-T	Amortiguador salino de tris con tween 20
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
PVDF	Fluoruro de Polivinideno
PBS	Amortiguador salino de fosfatos

Resumen

SOTO GUILLÉN TANIA MARILYN. Uso de Inmunohistoquímica y Western blot para evaluar presencia y asociación de apoptosis y autofagia en la regresión del parénquima testicular de gallos reproductores pesados, bajo la dirección de MVZ. M. en C. Socorro Magdalena Escorcía Martínez y M. en C. Omar Noel Medina Campos.

La regresión del parénquima testicular en gallos reproductores pesados se caracteriza por la pérdida de las células germinales a través de la vía apoptótica. Recientemente, se informó que la autofagia también puede estar implicada en dicho proceso, por este motivo, el objetivo de este estudio fue identificar en el parénquima testicular de gallos de 26, 33 y 55 semanas de edad, la presencia y asociación de apoptosis y autofagia, así como la correlación de estos 2 mecanismos con la edad del gallo. Utilizando Western blot, los resultados demostraron presencia y correlación significativa entre apoptosis y autofagia, para esta prueba se buscó la detección y medición de las proteínas caspasa-3 para apoptosis y LC3 para autofagia, no existiendo asociación entre la edad y ambos fenómenos de muerte celular. Por Inmunohistoquímica se identificó únicamente a la proteína caspasa-3. Se concluye que en parénquima de testículos de gallos la apoptosis y la autofagia están presentes y que ambos fenómenos no son mutuamente excluyentes ya que pueden ocurrir simultáneamente en el mismo tejido, interactuando entre sí y no como antagonistas, para inducir la muerte celular.

1. Introducción

1.1 Importancia del gallo reproductor pesado

El gallo reproductor pesado es el encargado de fecundar los huevos a partir de los cuales nacerán pollos destinados a la producción de carne. El objetivo del desarrollo de este gallo es transmitir información genética para que el pollo desarrolle grandes masas musculares, por este motivo, a este gallo se le denomina reproductor pesado.

Juega un papel esencial, debido a que llega a ser responsable de la fecundación de 1,000 – 2,000 huevos (Canela, 2013).

Una disminución de la fertilidad en los gallos es devastadora para la producción del pollo de engorda, porque un huevo infértil no sólo representa la pérdida de un pollo, sino también de la genética, la productividad de la gallina, así como un valioso espacio en la incubadora e incluso del trabajo humano (Pérez, 2013).

1.2 Anatomía y fisiología de los testículos de gallo

Los testículos de las aves son intraabdominales y, a diferencia de la mayoría de los mamíferos, no migran desde su sitio de origen embriológico, por lo tanto, están estrechamente relacionados, topográficamente, con los riñones (Foto 1). Como en los mamíferos, las aves tienen dos testículos, uno a cada lado de la línea media, bordeando lateralmente la aorta y la vena cava caudal. Están unidos desde sus bordes dorso-mediales a la pared abdominal dorsal por un mesorquio corto. Topográficamente, los polos craneales de los testículos se encuentran cerca del borde ventral de los pulmones, mientras que sus polos caudales se encuentran cráneo-ventrales a las divisiones craneales de los riñones (Barrie, 2007).

Tienen forma de frijol, presentan un color blanco lechoso, su tamaño y desarrollo muestran una marcada variación asociada con la edad y la raza. Además son ligeramente asimétricos, siendo generalmente el testículo izquierdo mayor que el derecho y durante el período de actividad sexual pueden llegar a medir 5 cm de largo y 2.5 cm de ancho (Brugère, et al., 2015; Horst, et al., 2016).

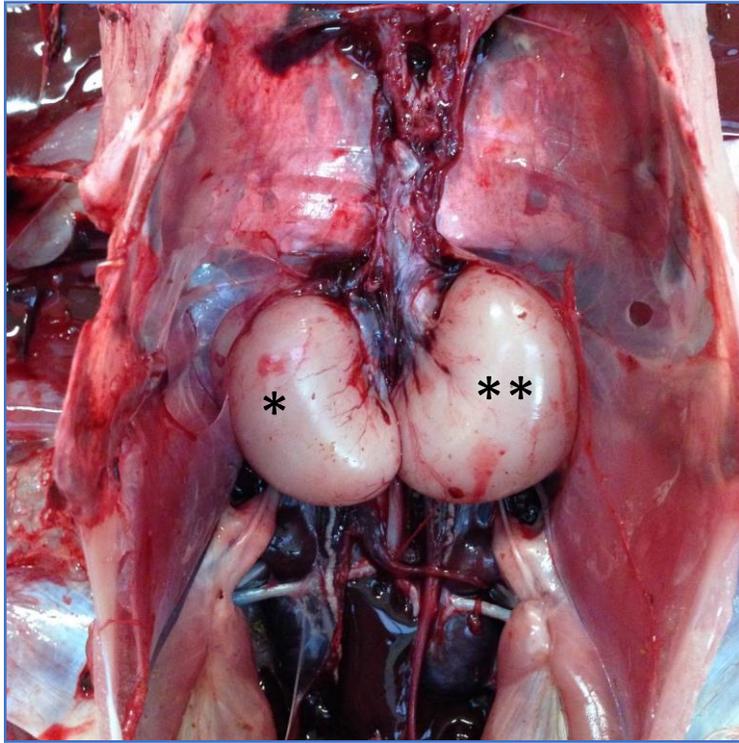


Foto 1. Se observan los Testículos de gallo (*) Derecho (**) Izquierdo.

Una Arteria Testicular corta surge de la Arteria Renal craneal, y corre hacia los testículos a lo largo de su borde dorso-medial, irrigándolos. Una o dos Arterias Testiculares accesorias cortas pueden originarse directamente desde la Aorta, unilateral o bilateralmente, y de manera similar llegar al hilio de los testículos. Las Arterias Testiculares recorren cortos cursos hacia el hilio donde se dividen en Asas Intratesticulares. Las venas que drenan la sustancia testicular son afluentes de venas más grandes que corren periféricamente hacia la cápsula testicular. Estas últimas son grandes, anchas y claramente visibles, ya que corren radialmente hacia el hilio del cual emergen y se abren en la vena cava caudal como numerosas venas cortas (Barrie, 2007). Esta red vascular, participa en la termorregulación del parénquima testicular (Horst, et al.,2016).

El parénquima testicular consta de dos compartimentos:

1. Área tubular: en esta región se localizan los túbulos seminíferos y se produce la espermatogénesis. El epitelio de los túbulos seminíferos tiene dos tipos de células: (a) células fijas, somáticas, representadas por las células de Sertoli que son las únicas células del epitelio que no se dividen y que son necesarias para el desarrollo de las células germinales, desde la espermatogonía hasta los espermatozoides,

porque proporcionan soporte físico y nutricional. (b) células germinales temporales y móviles que comprenden una serie de células que se diferencian en: espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermatidas y finalmente espermatozoides. Las células germinales generalmente se desarrollan a medida que se mueven de la membrana basal del epitelio seminífero hacia la luz tubular. Por lo tanto, las células germinales más primitivas o inmaduras se encuentran en la membrana basal y las células germinales maduras, los espermatozoides, recubren la luz del túbulo seminífero (Barrie, 2007; González, et al.,2010).

2. Área intersticial o intertubular: consta de dos componentes principales. El primero es una capa compacta de miofibroblastos y tejido conectivo que rodea de cerca el túbulo seminífero, y se conoce como el tejido límite. El otro es el tejido conectivo laxo, el intersticio, que se encuentra entre los túbulos seminíferos, con expresión completa en las áreas angulares o cuñas entre 3 o más túbulos seminíferos adyacentes. El tejido límite o peritubular consiste en tejido subepitelial y capas de células alargadas alternas y su tejido amorfo interconectado. El intersticio, por otro lado, consta de células de Leydig las cuales son células poliédricas grandes y eosinofílicas, contienen inclusiones lipídicas de manera característica y secretan testosterona. Las células de Leydig pueden observarse individuales o en grupos de unas pocas; el intersticio también presenta vasos sanguíneos y fibroblastos (Barrie, 2007; González, et al., 2010; Ross 2008).

Se describen tres periodos en el desarrollo testicular: en el periodo puberal los gallos reproductores pesados alcanzan la madurez sexual entre las **23 y 25** semanas de edad. En el periodo adulto, se da el pico de la fertilidad a las **33** semanas de edad. Y en el periodo senil, se produce una caída drástica de la fertilidad a partir de las 45 semanas de edad teniendo cambios importantes en el parénquima testicular a las **55** semanas de edad y terminando el ciclo productivo a las 65 semanas de edad. (Cobb, 2008; Sarabia, et al., 2012).

Teniendo en cuenta estos procesos se describen a detalle cada uno de los periodos:

Periodo puberal: cubre el período entre 23 y 28 semanas de edad. Durante esta fase, el diámetro tubular aumenta lentamente de 0.19 mm a las 25 semanas, y 0.24 mm a las 28 semanas de edad. En las células de la línea germinal, podemos comenzar a observar células en diferentes etapas de maduración: espermátocitos primarios, espermátocitos secundarios, espermátidas redondas y alargadas y espermatozoides en la luz tubular (Sarabia, et al., 2012).

Periodo adulto: definida por la edad de 30 a 50 semanas, se correlaciona con la integridad funcional del testículo, que corresponde a los valores de porcentaje de eclosión que son los más altos para el lote. En este periodo el diámetro tubular incrementa a 0.27 mm, encontrándose en su máximo desarrollo y se le relaciona con una buena producción de semen. El máximo desarrollo funcional se alcanza a las 36 semanas de edad (Sarabia, et al., 2012).

Periodo senil: en esta última fase, hay cambios más pronunciados que corresponden a gallos de 55 semanas de edad. Se presenta un diámetro tubular similar de 0.26 mm, pero una disminución en el número de espermatozoides en la luz tubular. Las características histológicas de estos testículos corresponden a una atrofia leve o moderada, disminución de la producción de esperma, desprendimiento de células inmaduras del epitelio germinal a la luz tubular, adelgazamiento del epitelio germinal, engrosamiento del espacio intersticial que parece estar invadido por fibroblastos y fibras de colágeno, hialinización de las membranas basales, aparición de espermátidas multinucleadas y calcificación (Sarabia, et al., 2012).

1.3 Espermatogénesis

La duración de la espermatogénesis en el gallo se ha estimado entre 12 y 13 días y es un proceso complejo que comienza con la proliferación mitótica de espermatogonias, después dos fases meióticas (I y II) para dividirse en espermátidas con cromosomas haploides. En los espermátocitos primarios se lleva a cabo la división meiótica I que da origen a los espermátocitos secundarios, los cuales tienen una vida relativamente corta porque la división meiótica II ocurre

inmediatamente para producir espermátidas. La espermiogénesis es la fase posterior en el proceso de la espermatogénesis y durante este periodo las espermátidas haploides se diferencian morfológicamente convirtiéndose en espermatozoides (Barrie,2007; Asano et al., 2018).

1.4 Regresión testicular

Los mecanismos de regresión testicular se manifiestan como una disminución de tamaño, peso, producción de células germinales y semen, y varían entre las especies. La mayoría de los estudios han señalado a la apoptosis como el principal evento celular responsable de la regresión testicular (Massoud, et al., 2018). Sin embargo, en 2018, González y cols. (2018), trabajando con la vizcacha, *Lagostomus maximus* (un roedor típico de Sudamérica), propusieron un nuevo mecanismo de regresión testicular señalando que es el equilibrio entre la autofagia y la apoptosis lo que regula este proceso.

Durante las estaciones desfavorables donde existe escasez del alimento, y cambios drásticos de temperatura, en muchas poblaciones de aves silvestres, los testículos sufren un cambio histológico que incluye regresión o atrofia de los túbulos seminíferos. En contraste, las aves domesticadas han perdido esta dependencia estacional y exhiben un desarrollo testicular que es independiente del clima y está más relacionada con problemas de vejez o enfermedad.

La regresión testicular se considera un problema multifactorial en los que se incluyen, niveles hormonales de testosterona, el desarrollo del tejido testicular, el comportamiento de jerarquía en la parvada y la composición corporal relacionada con el peso. Se ha informado que los gallos con un peso corporal bajo a menudo tienen testículos subdesarrollados (Sarabia, et al., 2012).

El peso corporal de los gallos reproductores pesados normalmente se duplica a lo largo del ciclo productivo, a las 6 semanas de edad pesan aproximadamente 2.5 Kg y a las 55 semanas de edad alrededor de los 5 Kg. Y el peso testicular sufre un explosivo aumento de tamaño entre las 19 y 23 semanas de edad, y de la masa (peso total de ambos testículos) que será de aproximadamente 1 g a más de 50 g. Más tarde, con la aparición de la regresión testicular, aproximadamente el 44% del peso se puede perder entre las 36 y 55 semanas de edad, lo que resulta en un

testículo de 29.5 g al final de la vida del gallo. Lo anterior coincide con una caída drástica en la fertilidad en parvadas reproductoras a partir de las 45 semanas de edad. (Sarabia, et al., 2012).

La regresión testicular es el resultado de la combinación en la reducción de la tasa de división celular y el agotamiento masivo de células germinales (Jiménez, et al., 2015).

Se ha observado que los testículos activos sólo contienen algunas pocas células en apoptosis en un número reducido de túbulos seminíferos, mientras que el número de células apoptóticas es notablemente mayor en los testículos inactivos. Las células de Sertoli no se ven afectadas en este proceso, por el contrario, se observa una pérdida masiva de células germinales mediada por la apoptosis en los testículos inactivos de *H. auritus* (erizo orejudo) (Massoud, et al., 2018).

1.5 Apoptosis

Se definió como muerte celular programada empleada por el organismo como mecanismo regulatorio, su función es la de controlar el número de células del tejido u órgano, limitando su tamaño y eliminando células viejas que han cumplido su ciclo y función, e interviene en condiciones patológicas, cuando las células han sufrido algún daño no reparable inducidos por distintos estímulos nocivos como el calor, radiación, fármacos citotóxicos que provocan daños irreversibles del ADN. Además, juega un papel muy importante en el desarrollo embriológico (Kumar, 2004; Hernández, 2018).

Las alteraciones morfológicas de la muerte celular apoptótica que importan tanto al núcleo como al citoplasma son remarcablemente similares en todos los tipos celulares y especies (Sosa, 2012). Microscópicamente la apoptosis se puede identificar porque las células presentan núcleos picnóticos, pérdida de asimetría de las membranas (Thurston, et al., 2019), las células se retraen con rapidez, y se dividen en cuerpos apoptóticos compuestos por vesículas de citosol y organelos rodeados de membrana. Estos fragmentos se expulsan y fagocitan o degradan enseguida. La apoptosis no desencadena una reacción inflamatoria (Kumar, 2004).

Existen tres tipos principales de cambios bioquímicos que pueden verse en la apoptosis, 1) activación de las caspasas, 2) rotura de DNA y otras proteínas y 3) cambios de la membrana y reconocimientos por parte de las células fagocíticas (Hayat, 2014).

Las caspasas son elementos centrales al mecanismo de la apoptosis ya que son tanto iniciadoras como ejecutoras del proceso. Las dos rutas de activación de las caspasas descritas en mamíferos son la intrínseca (Hayat, 2014) o mitocondrial y la vía extrínseca o del receptor de muerte.

Respecto a la vía intrínseca ésta se encuentra estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Estímulos tales como un daño genético irreparable, hipoxia, concentraciones extremadamente altas de calcio citosólico y un estrés oxidante severo desencadenan su ejecución. Esta vía es el resultado de un aumento en la permeabilidad mitocondrial y de la liberación de moléculas proapoptóticas tales como el citocromo c, hacia el citoplasma.

Por otro lado, la vía extrínseca o del receptor de muerte, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor. Se han descrito varios receptores de muerte, siendo los más conocidos el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) tipo 1 (TNFR1) y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) así como sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente. Ambas vías finalmente llevan a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis (Sosa, 2012).

La fase de ejecución de la apoptosis involucra la activación de una serie de caspasas. En la vía extrínseca las caspasas que se activan son la 8 y la 3 y en la vía intrínseca se activan las caspasas 9 y 3 (Velázquez, 2004). Ambas convergen en la activación de la caspasa efectora 3, la cual regula el desmantelamiento de diversas estructuras celulares mediante la división de sustratos específicos (Sosa, 2012).

La apoptosis es un proceso esencial que ocurre normalmente en los testículos fértiles funcionales. Facilita la regulación de la densidad de la población de espermatogonias y protege la integridad genética del gameto masculino al eliminar las células que no pueden pasar las transiciones del punto de control derivadas de una sinapsis cromosómica meiótica inadecuada (Massoud, et al., 2018).

1.6 Autofagia

La autofagia se identificó por primera vez en levaduras, en las que se identificaron 31 genes, denominados genes autofagilados (Atgs), que están involucrados en la ejecución de la autofagia.¹⁵ (Hayat, et al., 2014). Actualmente la autofagia se define como un proceso dinámico y programado (Aránguiz, et al., 2006) que comienza cuando el material intracelular que va a ser degradado es englobado por una doble membrana que crece hasta cerrarse por completo para formar un organelo llamado autofagosoma. El proceso continúa con la fusión de este autofagosoma con el lisosoma, un organelo que contiene enzimas hidrolíticas que degradan el material celular, y de este autofagolisosoma, los productos finales de la degradación como los aminoácidos, los ácidos grasos, los azúcares y los nucleótidos, a través de transportadores salen al citoplasma donde pueden ser reciclados y utilizados en nuevos procesos celulares (Boya, 2017).

La autofagia se induce en células sometidas a condiciones de estrés tales como hipoxia, privación de nutrientes, altas temperaturas o estrés oxidante (Ramírez, et al., 2016) y cuando ocurre, partes de la célula que no sirven o que resultan perjudiciales para su sana supervivencia son eliminados, y los desechos se aprovechan para generar energía. Por esta razón, la señal de inicio de autofagia no necesariamente se origina por el daño intracelular (Costas, 2017).

La proteína 1A/1B de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3) es ampliamente utilizada como marcador de autofagia (Cereceda, 2012). Esta proteína LC3 está en el citoplasma en forma inactiva y cuando se dan las condiciones de activación de la autofagia es cortada en el extremo carboxilo por proteasas de la familia de proteínas asociadas a autofagia (ATG4) que la convierten en LC3-I cuyo residuo de glicina expuesto, en respuesta a estímulos autofágicos, se conjuga con el fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) en una reacción mediada por ATG7, ATG3 y el complejo ATG12-ATG5:AG16L. De esta forma se genera la forma asociada a lípidos (lipidada) LC3-PE también conocida como LC3-II que participa en la elongación de los autofagosomas guiando la curva de la membrana alrededor del material a engullir (Acevo, 2017; Martínez, 2017).

1.7 Interacción entre apoptosis y autofagia

Bajo condiciones de estrés, los procesos de supervivencia y muerte se activan simultáneamente y el resultado final depende de un complejo equilibrio entre autofagia y apoptosis las cuales están muy relacionadas pues comparten reguladores moleculares clave. En general, la autofagia funciona como una respuesta citoprotectora inducida tempranamente que favorece la adaptación al estrés mediante la eliminación de los componentes subcelulares dañados. La autofagia puede proteger las células al evitar que sufran apoptosis y aunque no se conoce el mecanismo exacto subyacente a esta protección, se ha sugerido que el papel del secuestro mitocondrial dañado evita que el citocromo c liberado pueda formar un apoptosoma funcional en el citoplasma. (Hayat, 2014).

En los últimos años, la autofagia ha ganado relevancia como mecanismo que en conjunto con la vía intrínseca de la apoptosis controla la homeostasis de los tejidos y la supervivencia celular actuando como una vía de muerte alternativa a la apoptosis o como un mecanismo de adaptación al estrés para evitar la muerte celular por lo que el desequilibrio entre ambos procesos tendría importantes consecuencias fisiopatológicas. Desafortunadamente en la actualidad la información del papel de la autofagia en los testículos es escasa (González, et al., 2018)

1.8 Técnicas de laboratorio para la identificación de proteínas de marcaje

1.8.1 Western Blot

Mediante el uso de Western blot, se pueden identificar proteínas específicas de una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células. La técnica utiliza tres elementos para realizar esta tarea: (1) separación por tamaño, (2) transferir a un soporte sólido y (3) marcar la proteína objetivo usando un anticuerpo primario y secundario adecuado para visualizar (Yang, et al., 2015).

En esta técnica, una mezcla de proteínas se separa en función del peso molecular y, por lo tanto, por tipo, mediante electroforesis en gel. Estas proteínas luego se transfieren a una membrana que es incubada con dos anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo

secundario se une al anticuerpo primario. Para evidenciar las bandas, se pueden utilizar técnicas de Quimioluminiscencia. El grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente (Yang, et al., 2015; Milton, 2019).

1.8.2 Control de carga

Para poder interpretar los resultados del Western blot es necesario utilizar controles de carga. Los controles de carga generalmente son proteínas estructurales de las células que aseguran que la misma cantidad de muestra proteica es cargada en cada carril, con lo que se asegura que las proteínas de todos los carriles son transferidas a la membrana con la misma cantidad y que la detección de la señal es uniforme en todos los carriles. Algunos ejemplos de estas proteínas son: actina, tubulina, vinculina, etc. (Johnson, 2018)

Las señales de los controles de carga se utilizan frecuentemente para normalizar las señales de las proteínas de interés. (Johnson, 2018)

1.8.3 Inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica es una técnica que permite la detección *in situ* de cualquier tipo de proteína en secciones de tejido. Basado en la interacción antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos específicos contra el antígeno de interés son visualizados por medio de una señal de color, comúnmente generada por la acción de una enzima sobre un cromógeno, lo que permite evaluar la prueba mediante microscopía óptica simple.

Una vez montado el tejido en la laminilla, el procedimiento a grandes rasgos es el siguiente: recuperación antigénica, bloqueo de enzimas y proteínas endógenas, aplicación de anticuerpo primario, aplicación de anticuerpo secundario, aplicación del cromógeno y la contratinción (Martín, et al., 2012; Aguayo, 2016).

1.9 Impacto económico

A modo de entender lo que representa en costos un buen funcionamiento del parénquima testicular del gallo reproductor pesado se plantea el siguiente ejemplo: la relación macho-hembra es 1:10, el promedio de pollitos por gallina en su ciclo productivo a las 60 semanas es de 134. Esto nos da como resultado que un gallo tiene como tarea fertilizar 1680 huevos de los cuales se espera un nacimiento de

1340 pollitos. (Ávila, E. et al., 2018). El peso promedio del pollo de engorda en pie en la ciudad de México para el año 2018 fue de 2.8 kg al finalizar su ciclo productivo (FIRA, 2019). El precio pagado por el ave en pie llegó a 25.56 pesos por kilogramo para el 2018. (Dirección de investigación y evaluación económica sectorial, 2019).

El párrafo anterior verifica la importancia del papel que desempeña el gallo reproductor pesado, contribuyendo potencialmente a la generación de 95,901.12 pesos a lo largo de su ciclo productivo.

La industria avícola en México es la actividad pecuaria más dinámica y uno de los sectores más destacados para la alimentación de los mexicanos. Representa el 63.8 % de la producción pecuaria nacional donde el 34.7% corresponde a la producción de carne con un consumo per cápita de 32.9 kg en el 2017. (UNA, 2018). Aún cuando la producción nacional es significativa, es necesario realizar importaciones de Estados Unidos, Brasil y Chile para satisfacer la demanda interna (Sader, 2018). Esta es la importancia de una producción eficiente para cubrir la demanda en el país.

1.10 HIPÓTESIS

Existe presencia y asociación entre apoptosis y autofagia en el parénquima testicular de gallos reproductores pesados y ambos fenómenos están presentes en la regresión testicular.

1.11 OBJETIVO

1.11.1 General

Identificar presencia y asociación de apoptosis y autofagia en el parénquima testicular de gallos reproductores pesados de 26, 33 y 55 semanas de edad mediante Western blot e Inmunohistoquímica.

1.11.2 Específicos

- Identificar la presencia de apoptosis con el marcador anti-caspasa-3 activada, utilizando las técnicas de Western blot e Inmunohistoquímica.

- Identificar la presencia de autofagia con el marcador anti-LC3, utilizando las técnicas de Western blot e Inmunohistoquímica.
- Establecer mediante pruebas estadísticas si existe asociación entre apoptosis y autofagia con la edad de los gallos.
- Establecer mediante pruebas estadísticas si existe asociación entre apoptosis y autofagia.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU): 2-amino-2 hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), cloruro de sodio (NaCl), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tritón X-100, desoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS), anti- α -tubulina, coctel de inhibidores de proteasas (p840), albúmina sérica bovina (BSA) y tween-20. El marcador de peso molecular Dual color standards #1610374, fue adquirido de Bio-Rad Laboratorios (Hércules, CA, EUA). Las membranas de floruro de polivinilideno (PVDF) se adquirio de Millipore Corp. (Billerica, MA, EUA). El anticuerpo primarios Anti-LC3B ab48394 fue adquirido de Abcam (Cambridge, MA, EUA), contra caspasa-3 sc-271759 de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tx. EUA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes (para fluorescencia verde: IRDye® 800CW y para fluorescencia roja: IRDye® 680RD) se adquirieron de LI-COR Biosciences, (Lincoln, NE, EUA). Las bolsas sellables fueron de Thomas Scientific; Swedesboro, NJ, EUA; # cat. 1312A40).

Evaluación del control de carga

- Se utilizó el anticuerpo primario anti- α -tubulina en una dilución 1:5000 (T8203 de Sigma-Aldrich): detecta bandas de aproximadamente 50 kDa.

Evaluación de marcador para apoptosis

- Se utilizó el anticuerpo primario caspasa-3 en una dilución 1:1000,(271759 de Santa Cruz Biotechnology): detecta bandas de aproximadamente 11 kDa.

Evaluación de marcador para autofagia

- Se utilizó el anticuerpo primario anti-LC3B en una dilución 1:1000, (ab48394 de Abcam): detecta bandas aproximadas de 17kD (LC3-II) y bandas de 19 kDa (LC3-I).

2.2 Población objetivo

La población de la cual se obtuvo los órganos que formaron la muestra de estudio estuvo constituida por lotes de gallos con edades desde 26 hasta 55 semanas de edad, de una granja comercial de reproductores pesados de la estirpe Cobb-500. La muestra se obtuvo de manera aleatoria por lote y se establecieron tres grupos de estudio de acuerdo con su edad: 26, 33 y 55 semanas de edad. Se buscó incluir en el trabajo, las edades claves del gallo, desde el punto de vista reproductivo, considerándose al grupo de gallos de 55 semanas de edad, como el representativo de la regresión testicular, basándonos en artículos científicos que lo señalan ([Sarabia, et al., 2012](#)).

La toma de los testículos se realizó respetando los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*

2.3 Manejo de los testículos

Se trabajó con los testículos izquierdos de cada gallo. El tamaño de muestra por grupo fue de n=10.

Los testículos se lavaron con solución salina fisiológica para retirar los excesos de sangre, y posteriormente se tomó un corte de 0.5 cm de grosor de la región del ecuador y se prepararon para análisis histológico e inmunohistoquímico colocándolos en una solución de formalina amortiguada al 10%, el resto del tejido se mantuvo en conservación a -70°C hasta su manejo.

2.4 Extracción de proteínas

Se tomó una muestra de forma individual de aproximadamente 100 mg de cada testículo colocándose en tubos de ensayo. En cada tubo se colocó buffer de Radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris- HCl 40 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10 %, Tritón X-100 al 1% , Desoxicolato de Sodio al 0.5 % y

Dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.2 %, pH= 7.6), en una dilución 1:10 en relación con el peso del tejido y 5 ul de un coctel de inhibidores de proteasas por cada ml de RIPA. Cuando estuvo listo el tubo con el preparado se realizó el homogenizado con un Polytron® durante 15 segundos con cada uno. Cuando se obtuvo el homogenizado se transfirió a tubos Eppendorf para posteriormente centrifugarlos a 10,000 x g a 4°C durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante que se transfirió a tubos para centrifuga de 1.5 ml.

2.5 Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas en las muestras de testículos se determinó usando el método de Lowry (Gallegos, 2019), para el cual se preparó una curva estándar a partir de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.05%. Las concentraciones de la curva fueron 0, 5, 10, 15, 25, 35, 50 ug/200 ul. La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante la interpolación usando los valores de regresión de la curva estándar y corrigiendo por la dilución empleada (1:60).

Esta determinación se realizó por triplicado de la siguiente manera: En una placa de 96 pozos se incubaron 54 ul de estándares o de muestras con 270 ul de la solución reactiva (Na₂CO₃ al 2%, NaOH al 0.4%, tartrato de sodio al 0.02% y CuSO₄ al 0.5%) durante 10 minutos y luego se añadieron 27 ul de Folín 1 N. Después de 30 minutos se leyó la densidad óptica a 660 nm en un lector multimodal de placas Synergy HT (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA).

2.6 Western blot

2.6.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida al 15% en el sistema vertical Mini-PROTEAN® de 1 mm de grosor con un peine para 15 pozos (ver anexo A).

En cada gel se colocaron 12 muestras que correspondieron a 4 muestras de cada grupo de edad (26, 33 y 55 semanas).

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: En un tubo para centrifuga de 1.5 ml se mezclaron 7.5 ul de muestra (30 ug de proteína) con 7.5 de amortiguador de carga Laemmli 2X y se colocaron en un baño maría a 70°C

durante 5 minutos al igual que un tubo que contenía 0.5 ul del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color) mezclado con 10 ul de amortiguador de Laemmli 2X.

El contenido de cada tubo se colocó en cada pozo del gel y la corrida electroforética de las muestras se realizó aplicando una corriente de 80 volts durante 2.5 horas.

2.6.2 Transferencia

Para transferir las proteínas del gel a la membrana de Fluoruro de Polivinideno (PVDF) previamente activada con metanol durante 15 segundos y luego colocada en amortiguador de transferencia durante 15 minutos, se empleó una cámara de transferencia húmeda. Este proceso se realizó aplicando una corriente de 400 AmP durante 70 minutos. Para comprobar la transferencia las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau.

2.6.3 Preparación de anticuerpos y membranas

Cada membrana se bloqueó sumergiéndola en una solución de leche en polvo descremada al 5% en amortiguador salino de tris con tween-20 al 0.1% (TBS-T) en la que se mantuvo en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

La solución de bloqueo se eliminó por decantación y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-T en agitación.

Anticuerpos primarios.

Para la incubación con los anticuerpos correspondientes a autofagia y apoptosis, así como al control de carga (tubulina), las membranas se introdujeron en bolsas sellables en las que se introdujeron 3 ml de solución de anticuerpos anti-LC3 (1:1,000)/anti-tubulina (1:5,000) o de anticuerpos anti-caspasa-3 (1:1,000)/anti-tubulina (1:5,000). Las membranas se colocaron en agitación constante durante toda la noche a 4°C y luego se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBS-T.

Anticuerpos secundarios

Como anticuerpos secundarios se usaron anticuerpos acoplados a moléculas que fluorescen cerca del infra-rojo y estas soluciones se prepararon en TBS-T.

Las membranas previamente incubadas con los anticuerpos primarios anti-LC3 se colocaron en 3 ml de solución de anticuerpo secundario anti-conejo para fluorescencia verde (IRDye® 800CW; diluido 1:10,000) mientras que las membranas incubadas con anticuerpos primarios anti-caspasa-3 fueron incubadas con 3 ml de solución de anticuerpo secundario anti-ratón para fluorescencia roja (IRDye® 680RD; diluido 1:10,000).

La incubación con los anticuerpos secundarios fue de 1 hora (con agitación constante dentro de un recipiente oscuro). Después de esto se realizaron 2 lavados de 10 minutos con TBS-T y uno de 10 minutos con amortiguador salino de fosfatos (PBS).

2.6.4 Revelado y cuantificación

La detección de la señal fluorescente de los anticuerpos secundarios se hizo en un equipo Odyssey® Sa Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) y el análisis densitométrico se realizó con el software Image Studio Digits Ver 5.2 (LI-COR Biosciences).

2.7 Inmunohistoquímica

Las muestras de testículo para Inmunohistoquímica fueron fijadas en formol al 10% durante 24 horas para después ser procesadas mediante la técnica de rutina de inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 3 micrómetros de grosor (Micrótomo de la marca Leica modelo 2125RT), los cuales fueron montados en laminillas electrocargadas comerciales. (Aguayo 2016).

Desparafinación e hidratación

Se realizó por medio de calor durante 30 minutos en un horno a 60°C posteriormente se realizaron baños en concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 96%, 80%, 70%).

Recuperación antigénica

Se colocaron las laminillas en solución recuperadora de antígenos a pH bajo (diluida 1:10 en agua destilada) en un vaso de Coplin de plástico cerrado dentro de una olla de presión con agua destilada.

Bloqueo de peroxidasa endógena

Se colocaron las laminillas en una solución de peróxido de hidrógeno (diluida 1:5 en agua destilada) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Bloqueo de proteínas endógenas

Se colocaron 50 µl a cada laminilla de Background Sniper® durante 7 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

Anticuerpo primario

Se realizó la incubación en una cámara húmeda durante toda la noche en refrigeración a 4°C, colocando 50 µl en cada laminilla de los anticuerpos primarios anti-caspasa 3 y anti- LC3 diluido con PBS.

Anticuerpo secundario

La unión antígeno anticuerpo-primario fue evidenciada por medio de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection), se colocaron 50 µl del anticuerpo secundario sobre cada laminilla incubadas en una cámara húmeda durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Revelado

Se utilizaron 50 µl de diaminobencidina (DAB) (1ml DAB de sustrato buffer + 1 gota de DAB Chromogen) sobre los tejidos. Para establecer el tiempo de revelado se evaluó el control positivo.

Contratinción

Se utilizó hematoxilina para brindar contraste y facilitar la evaluación microscópica. La hematoxilina es una base que tiñe de manera preferencial los ácidos de las células, debido a que la mayoría de los componentes ácidos de las células son DNA y RNA, el núcleo y las regiones del citoplasma ricas en ribosomas se tiñen de azul oscuro (Aguayo, 2016).

2.7.1 Inmunohistoquímica caspasa-3

Recuperación antigénica: se utilizó solución recuperadora de antígenos a pH bajo durante 10 minutos.

Anticuerpo primario: policlonal caspasa-3 (NB600-1235) dilución 1:100 durante toda la noche a 4 °C

Revelado: 1 minuto

Controles positivos: Se utilizaron secciones de tejido de linfonodos (de perro) de casos previos con positividad conocida.

Controles negativos

Se utilizaron secciones de los mismos casos que los controles positivos, los cuales fueron cubiertos con solución amortiguadora (PBS) en lugar de anticuerpo primario.

Ver anexo C

2.7.2 Inmunohistoquímica LC3

Recuperación antigénica: se emplearon diferentes protocolos utilizando solución recuperadora pH bajo y alto durante 10, 20 y 30 minutos.

Anticuerpo primario: policlonal LC3B (ab48394) se emplearon diferentes protocolos utilizando diferentes diluciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 durante toda la noche a 4 °C.

Revelado: Se utilizaron diferentes protocolos en los que los tiempos fueron: 1 minuto, 50 segundos y 40 segundos.

Controles positivos: Se utilizaron secciones de: cerebro, hígado, musculo, corazón y testículo.

Ver anexo D

2.7.3 Evaluación Inmunohistoquímica

Caspasa-3

Para la observación de las laminillas se utilizó un microscopio Leica (DM500) con un programa para fotomicroscopio Leica Application Suite versión 3.3.0.

Se determinó marcaje positivo cuando se observó una marca café ocre intenso en citoplasma y núcleo. (Método de coloración inmunoenzimático, donde se utilizan

enzimas como la peroxidasa para convertir un cromógeno, en productos de color pardo o café, como resultado de su oxidación) (De Dios, 2018).

Se tomaron 10 campos en 40X al azar por cada testículo evaluado y se realizó la cuantificación de las células con marcaje positivo por campo de forma manual con la ayuda de un contador.

LC3

Para la evaluación de las laminillas procesadas se revisaron los controles positivos y negativos para dar validez a cada una de las corridas de la prueba. Sin embargo, en todos los protocolos utilizados se obtuvo un marcaje inespecífico el cual se presentó en núcleo.

2.8 Análisis estadístico

2.8.1 Western blot

Utilizando el escáner para quimioluminiscencia Odyssey® Sa Infrared Imaging System by LI-COR Biosciences con el software Image Studio Digits Ver 5.2, se hizo el revelado de las membranas colocándolas en una placa de cuarzo e introduciéndolas al lector.

El software arrojó una imagen con las bandas oscuras que representan la identificación de las proteínas (LC3-I, LC3-II y caspasa 3), a partir de las cuales se hizo la cuantificación por densidad óptica (grosor de la banda). Las unidades obtenidas de la medición son arbitrarias.

Las unidades normalizadas, se obtuvieron al utilizar el cociente de la densitometría que pertenece a la proteína de interés (LC3-I, LC3-II y Caspasa 3), entre la densitometría de la proteína utilizada como control de carga (tubulina), obteniendo un cociente. Ese cociente posteriormente se dividió entre el promedio de los cocientes obtenidos del grupo 1 (gallos de 26 semanas de edad), grupo que se utilizó como control.

El promedio de la desviación estándar de las unidades normalizadas de las proteínas de interés por grupo de edad se puede observar en el anexo B.

La comparación entre los grupos de edad se realizó a través de un Análisis de Varianza (ANDEVA) de un solo factor para un Diseño Completamente al Azar; en

el caso de las variables obtenidas con el Western blot se incluyó el uso de un bloque (membranas) por lo que el ANDEVA se realizó para un Diseño de Bloques al Azar.

Para estudiar la relación entre las variables obtenidas en el Western blot con las semanas de edad del ave se utilizó el método de Spearman.

Se fijó un nivel de significancia de $p= 0.05$ en todas las pruebas estadísticas.

Para las variables obtenidas del Western blot se obtuvieron: media, desviación estándar y mediana.

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico R (R Core Team [2017]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.8.2 Inmunohistoquímica

Para evaluar la variable de conteos de células con inmunopositividad, se realizó la prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis.

Para el análisis de correlación se utilizó el método de Spearman.

Se fijó un nivel de significancia del 5% en todas las pruebas estadísticas.

Para las variables obtenidas de la Inmunohistoquímica se obtuvieron: media, desviación estándar y promedio.

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico R (R Core Team [2017]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

3. RESULTADOS

3.1 Apoptosis (Western blot)

3.1.2 ANDEVA para grupo de edad-unidades normalizadas de caspasa-3

La evaluación de apoptosis mediante la expresión testicular de caspasa-3 muestra que no se encontraron diferencias entre los grupos de edad ($p > 0.05$), por lo que se concluye que las medias de las unidades normalizadas de caspasa-3 de los grupos de edad muestreados son iguales (Gráfica 1).

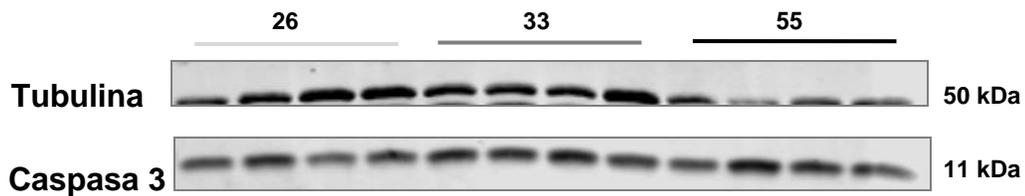
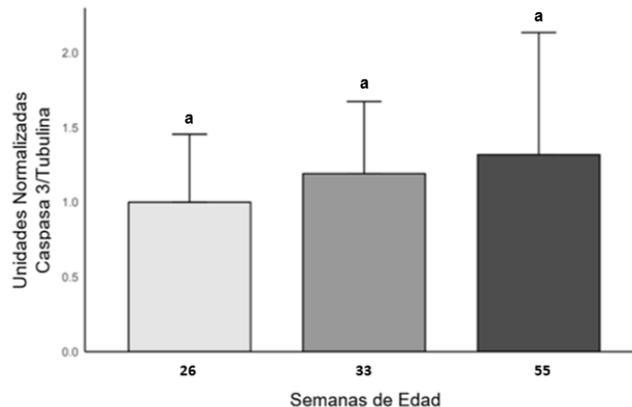


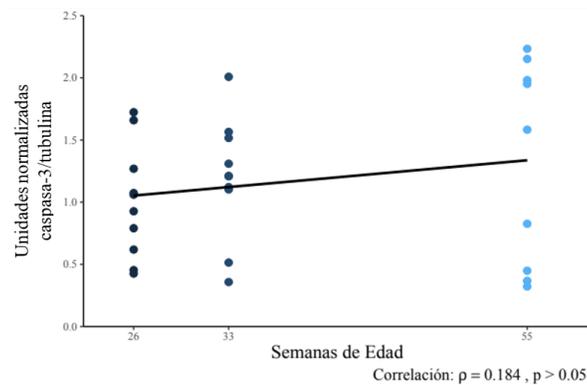
Foto 2. Western blot de muestras de testículos de gallos. Del carril 1 al 4 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 26 semanas de edad. Del carril 5 al 8 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 33 semanas de edad. Del carril 9 al 12 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 55 semanas de edad. Como se puede observar la banda en todos los carriles, indica la presencia de caspasa 3 en todas las muestras evaluadas. La tubulina corresponde al control de carga.



Gráfica 1. Cuantificación de la expresión de la proteína caspasa-3 como marcador de apoptosis en los testículo de gallos de 26, 33 y 55 semanas de edad. Las barras representan el promedio de los valores normalizados \pm DE. $n = 10$ (26 y 33 semanas) y $n = 9$ (55 semanas). Literales diferentes indican diferencias significativas entre los grupos, ($p > 0.05$).

3.1.2 Evaluación estadística mediante Spearman para unidades normalizadas de caspasa-3

A través del método de Spearman el valor de la correlación entre las unidades normalizadas de caspasa-3 y la edad de las aves es 0.1844115 con un nivel de significancia de 0.3382389, por lo que se concluye que no existe correlación entre dichas variables (Gráfica 2)



Gráfica 2. Distribución de los valores normalizados \pm DE de caspasa-3 por semana de edad. $n= 10$ (26 y 33 semanas) y $n= 9$ (55 semanas). No se encontró correlación entre las variables, ($p > 0.05$).

3.2 Autofagia (Western blot)

3.2.1 ANDEVA para grupo de edad-unidades normalizadas de LC3-I

No se encontraron diferencias entre los grupos de edad ($p > 0.05$), por lo que se concluye que las medias de las unidades normalizadas de LC3-I de los grupos de edad muestreados son iguales (Gráfica 3).

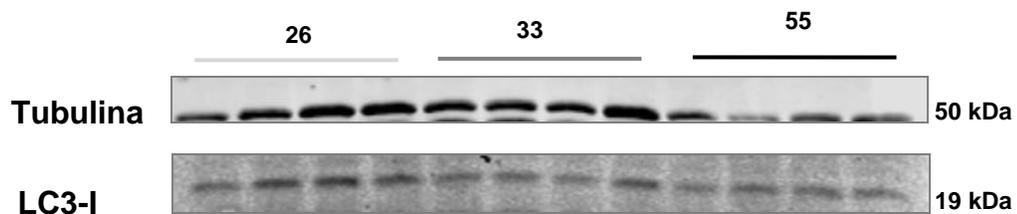
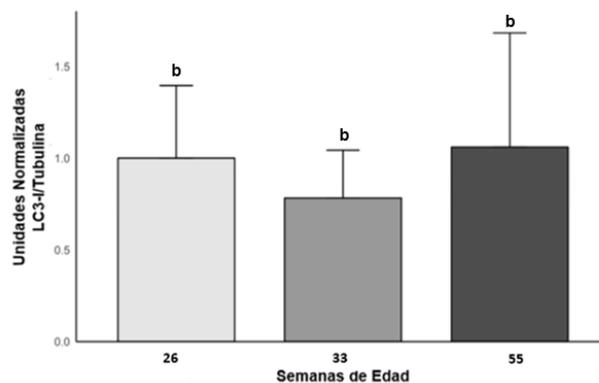


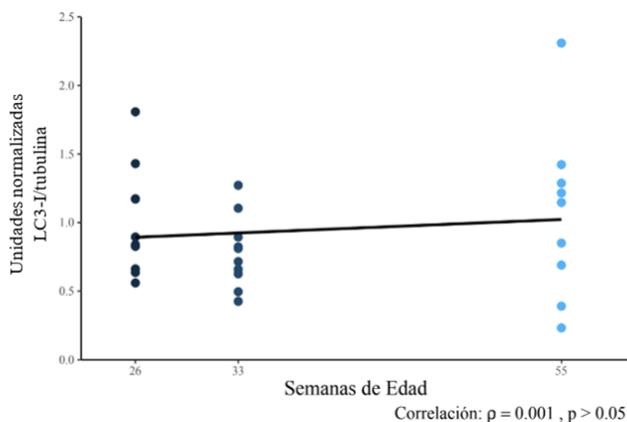
Foto 3. Western blot de muestras de testículos de gallos. Del carril 1 al 4 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 26 semanas de edad. Del carril 5 al 8 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 33 semanas de edad. Del carril 9 al 12 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 55 semanas de edad. Como se puede observar la banda en todos los carriles, indica la presencia de LC3-I en todas las muestras evaluadas. La tubulina corresponde al control de carga.



Gráfica 3. Cuantificación de la expresión de la proteína LC3-I como marcador de autofagia en los testículo de gallos de 26, 33 y 55 semanas de edad. Las barras representan el promedio de los valores normalizados \pm DE. $n= 10$ (26 y 33 semanas) y $n= 9$ (55 semanas). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos, ($p> 0.05$).

3.2.2 Evaluación estadística mediante Spearman para unidades normalizadas de LC3-I

A través del método de Spearman el valor de la correlación entre las unidades normalizadas de LC3-I y la edad de las aves es 0.001 con un nivel de significancia de 0.9967811, por lo que se concluye que no existe correlación entre dichas variables. (Gráfica 4)



Gráfica 4. Distribución de los valores normalizados \pm DE de LC3-I por semana de edad. $n= 10$ (26 y 33 semanas) y $n= 9$ (55 semanas). No se encontró correlación entre las variables, ($p>0.05$).

3.2.3 ANDEVA para grupo de edad-unidades normalizadas de LC3-II

No se encontraron diferencias entre los grupos de edad ($p > 0.05$), por lo que se concluye que las medias de las unidades normalizadas de LC3-II de los grupos de edad muestreados son iguales (Gráfico 5).

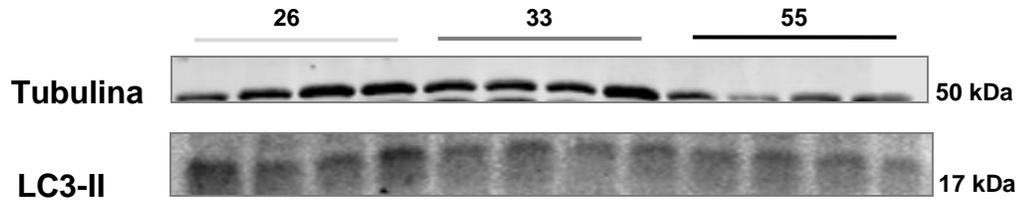
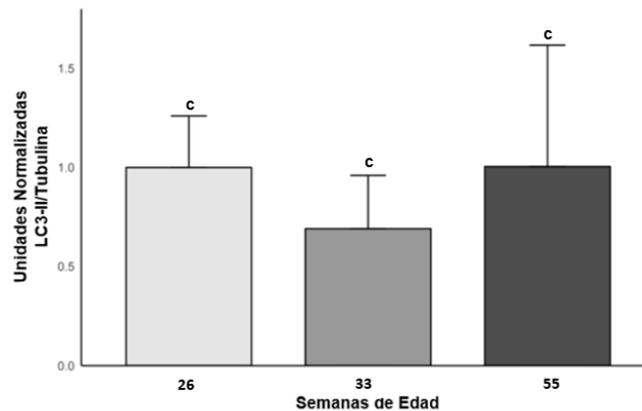


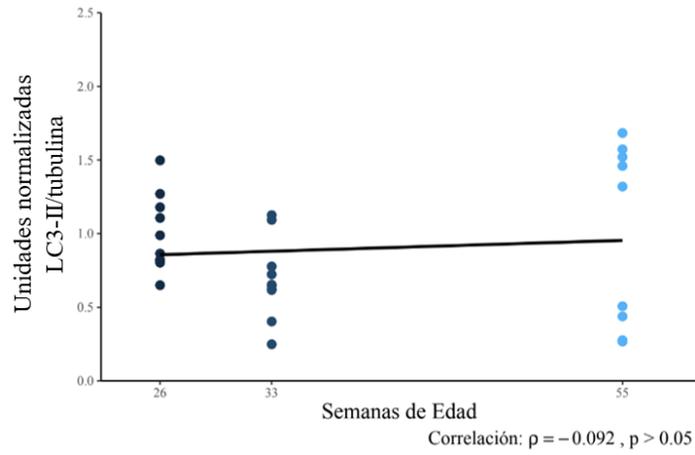
Foto 4. Western blot de muestras de testículos de gallos. Del carril 1 al 4 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 26 semanas de edad. Del carril 5 al 8 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 33 semanas de edad. Del carril 9 al 12 se colocaron las muestras de los testículos de gallos de 55 semanas de edad. Como se puede observar la banda en todos los carriles, indica la presencia de LC3-II en todas las muestras evaluadas. La tubulina corresponde al control de carga.



Gráfica 5. Cuantificación de la expresión de la proteína LC3-II como marcador de autofagia en los testículo de gallos de 26, 33 y 55 semanas de edad. Las barras representan el promedio \pm DE. El número de animales por cada grupo fue de 10 (26 y 33 semanas) y 9 (55 semanas). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos, ($p > 0.05$).

3.2.4 Evaluación estadística mediante Spearman para unidades normalizadas de LC3-II

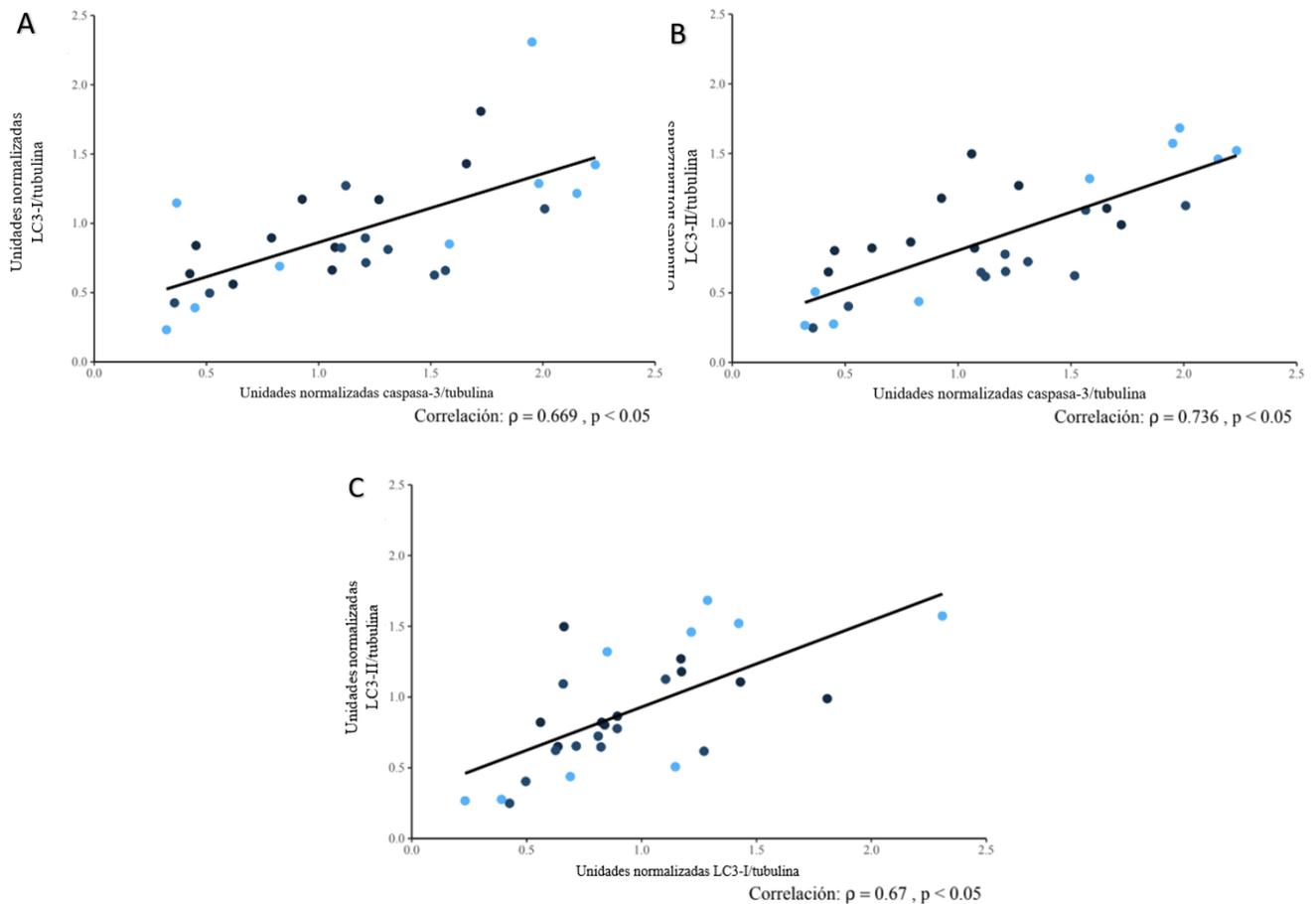
A través del método de Spearman el valor de la correlación entre las unidades normalizadas de LC3-II y la edad de las aves es -0.092467 con un nivel de significancia de 0.6333118 , por lo que se concluye que no existe correlación entre dichas variables. (Gráfica 6)



Gráfica 6. Distribución de los valores normalizados \pm DE de LC3-II por semana de edad. $n = 10$ (26 y 33 semanas) y $n = 9$ (55 semanas). No se encontró correlación entre las variables, ($p > 0.05$).

3.3 Asociación de apoptosis y autofagia

De acuerdo con los resultados del análisis de correlación por el método de Spearman se encontró correlación positiva entre las unidades normalizadas de caspasa-3 y LC3 siendo altamente significativas ($p < 0.05$). Es decir que un incremento de caspasa-3 implica un incremento tanto de LC3-I como de LC3-II, así como un incremento de LC3-I implica un incremento en LC3-II. (Gráfica 7)

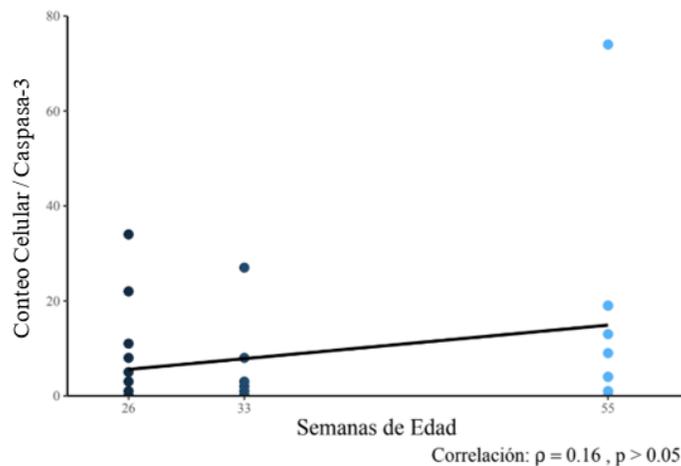


Gráfica 7. Análisis de correlación entre apoptosis y autofagia por el Método de Spearman para las unidades normalizadas de caspasa-3, LC3-I y LC3-II \pm DE. **A**, correlación entre caspasa-3 y LC3-I, **B**, correlación caspasa-3 y LC3-II. **C**, correlación LC3-I y LC3-II. $n = 10$ (26 y 33 semanas) y $n = 9$ (55 semanas), ($p < 0.05$).

3.4 Inmunohistoquímica Apoptosis

3.4.1 Evaluación estadística mediante Spearman para caspasa-3 en células con inmunopositividad.

A través del método de Spearman el valor de la correlación entre células con inmunopositividad de caspasa-3 y la edad de las aves es 0.1603159 con un nivel de significancia de 0.40611776, por lo que se concluye que no existe correlación entre dichas variables. (Gráfica 8)



Gráfica 8. Conteo de células con inmunopositividad para caspasa-3 por semana de edad. n= 10. No se encontró correlación entre las variables, ($p > 0.05$).

3.4.2 Evaluación estadística mediante la prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis

No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los grupos de edad para el conteo de células con inmunopositividad para caspasa-3.

3.4.3 Evaluación de células con inmunopositividad para caspasa-3

El marcaje para caspasa-3 se observó en núcleo y citoplasma y la intensidad del marcaje fue mayor en espermatogonias que en los espermatocitos primarios (Foto 5).

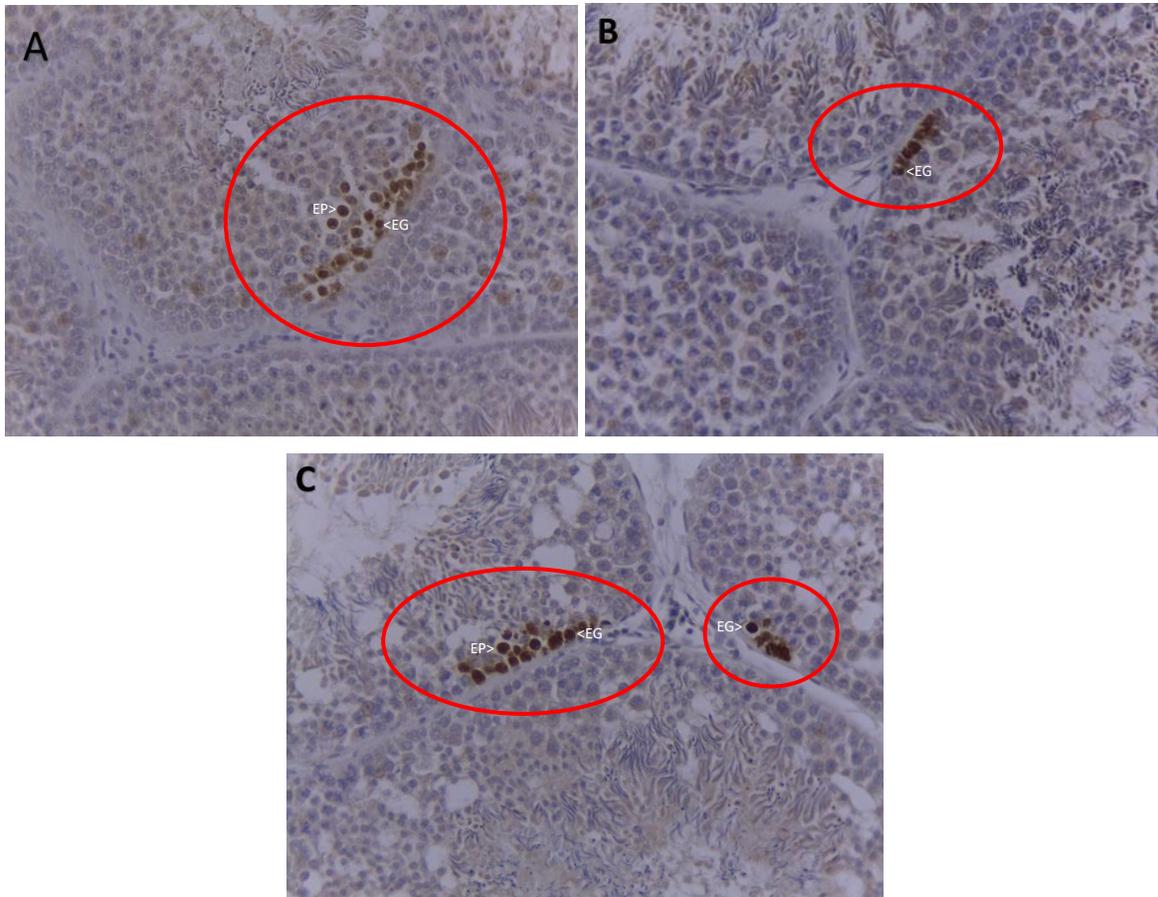


Foto 5. Se aprecia Inmunoposividad para caspasa-3 en espermatogonias y espermatocitos primarios (Círculo rojo). A) Corte histológico de testículo izquierdo de gallo de 26 semanas de edad. B) Corte histológico de testículo izquierdo de gallo de 33 semanas de edad. C) Corte histológico de testículo izquierdo de gallo de 55 semanas de edad. EG:espermatogonia; EP: espermatocito primario.

3.4.4 Inmunohistoquímica autofagia

El marcaje observado en todos los cortes histológicos fue nuclear para LC3 en todos los protocolos realizados sin embargo el marcaje debe ser citoplasmático. Por lo que consideramos que nuestro marcaje fue inespecífico en corazón, músculo, cerebro, hígado y testículo.

4.-DISCUSIÓN

En el presente trabajo, al igual que lo reportado por (Chen, et al., 2016; González, 2018; Morales, et al., 2007; Massoud, et al., 2018; Liu, et al., 2013), se logró la identificación de apoptosis en testículos de gallos reproductores pesados de la estirpe Cobb 500, sin embargo, a diferencia de los trabajos realizados por Cheng, et al., (2016), en el que reportaron que los testículos de ratas viejas (64 semanas de edad) presentaban mayor porcentaje de células en apoptosis en relación a lo que observaban en testículos de ratas jóvenes (48 semanas de edad), nosotros no pudimos evidenciar diferencias entre los grupos de edad de 26, 33 y 55 semanas de edad ($p > 0.05$) así mismo, nuestros resultados sobre asociación entre edad y presencia de apoptosis resultaron contrarios a los de Cheng et al., (2016), consideramos que los resultados obtenidos en el presente trabajo pudieron estar influenciados por la edad de los gallos, y por el manejo zootécnico de la parvada de donde se obtuvieron los gallos. Uno de los manejos zootécnicos que se practican rutinariamente en la granja donde obtuvimos nuestras muestras y que llamaron nuestra atención, fue que durante el periodo de crianza-desarrollo de los gallos, se les proporcionó el alimento para la gallina en las fases de iniciación (20% proteína, 2860 Kcal), crecimiento (18% proteína, 2650 Kcal), desarrollo (15% de Proteína, 2700 Kcal), posteriormente, en producción, se les proporcionó el alimento con los nutrientes específicos que debe consumir el gallo (13% proteína, 2700 Kcal). El alimento proporcionado en la fase de crecimiento no es el recomendado por la casa genética (4% más de proteína), (Anexo E). El manejo recomendado para la ración del gallo busca mejorar la fertilidad, especialmente si se disminuyen los niveles de proteína al 11-13%, con esto se busca controlar el peso corporal y el desarrollo del músculo de la pechuga (Guía de Manejo de Reproductoras). En relación al peso, el promedio en los 2 primeros grupos de edad estuvo por arriba del estándar y el tercero estuvo por abajo, por lo que también se debe descartar que este factor haya influido en la expresión de las proteínas evaluadas en el presente trabajo (Anexo F), el estudio realizado por (Xu et al., 2013) sugiere que la autofagia podría estar involucrada en la regulación de la homeostasis en diferentes condiciones patológicas, incluida la obesidad. Por lo

que para comprobar que el peso no sea una variable que intervenga en los resultados, el ideal es repetir los mismos ensayos con gallos con pesos iguales a lo establecido por la casa genética.

Estudios realizados por [Gonzalez et al., \(2018\)](#) encontraron inmunopositividad de caspasa-3 en testículos de Vizcacha. Coincidimos al encontrar marcaje de caspasa-3, observado en núcleo y citoplasma y la intensidad fue mayor en espermatogonias que en los espermatocitos primarios. Lo anterior es de esperarse ya que la literatura menciona que las espermatogonias son las células más sensibles en la línea germinal. ([Malaga et al., 2005](#)). Aproximadamente 75% de las espermatogonias mueren antes de alcanzar la madurez ([Kant et al., 2012](#)). Sin embargo, no se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre los grupos de edad.

Se logró la identificación por Western blot de LC3-I y LC3-II en testículos de gallos reproductores pesados de la estirpe Cobb 500, sin embargo, a diferencia de los trabajos con músculo realizados por [Nyvik,et al.,\(2019\)](#), en el que reportaron que la abundancia de LC3-I fue mayor en ancianos en comparación con los individuos jóvenes así como el nivel de LC3-II, nosotros no pudimos evidenciar diferencias entre los grupos de edad de 26, 33 y 55 semanas de edad ($p > 0.05$). Recomendamos tomar una muestra de gallos de más de 55 semanas de edad para observar posibles cambios. Ya que para confirmar que la autofagia es funcional, es necesario verificar que el flujo autofágico siga y que el aumento de la proteína LC3-I o LC3-II no se deba al bloqueo de la degradación. ([Acevo, 2017](#); [Martínez, 2017](#)).

En el caso de la Inmunohistoquímica para LC3B con todos los protocolos realizados el marcaje fue inespecífico.

Cabe señalar que el anticuerpo ha sido utilizado para esta técnica con éxito en ratón, rata, perro, humano, hámster, pez, pero no para pollos. Sin embargo, es importante resaltar que sí obtuvimos la identificación por WB con este mismo anticuerpo.

El Western blot es un método muy sensible con el que incluso se pueden detectar cantidades de hasta picogramos de la proteína de interés ([Najafov, et al., 2017](#)).

La sensibilidad es la capacidad de una prueba para detectar antígenos débilmente expresados. El término sensibilidad puede medirse por la cantidad dada de antígeno objetivo en un ensayo de base líquida, pero esto no es posible en secciones histológicas in situ; por lo tanto, la Inmunohistoquímica es una prueba descriptiva que proporciona solo una aproximación de cuanta positividad se puede esperar. (Torlakovic, et al., 2015).

Asociación entre autofagia y apoptosis

De acuerdo con los resultados del análisis de correlación por el método de Spearman se encontró correlación positiva entre las unidades normalizadas de caspasa-3 y LC3 siendo altamente significativas ($p < 0.05$). Es decir que un incremento de caspasa-3 implica un incremento tanto de LC3-I como de LC3-II, así como un incremento de LC3-I implica un incremento en LC3-II. Coincidiendo con los trabajos realizados por Gonzalez C et al.,2018: Zhang et al., 2012. Proponemos la existencia de una interacción entre la apoptosis y la autofagia que sería altamente dependiente en el contexto celular y podría modular los cambios en el epitelio seminífero. El equilibrio entre estos dos procesos podría determinar el destino final de las células. La autofagia parece contribuir a la eliminación de grandes masas de citoplasma o células y, por lo tanto, hace frente a la demanda de remodelación de tejidos. Esta precede a la apoptosis, enfrentando una respuesta adaptativa de una célula a afecciones subletales. Los organelos o membranas dañados pueden transferirse a la vía autofágica que sirve como respuesta de protección a escala subcelular y, en caso de que sobrepase los mecanismos de regulación y no se pueda controlar, puede producirse la eliminación de la célula completa. (Klionsky, 2003).

Si bien la apoptosis es un mecanismo bien estudiado, se sabe relativamente poco de los eventos moleculares que subyacen al inicio y la ejecución de la muerte celular autofágica.

5.- CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos mediante Western blot, en el presente trabajo, concluimos que tanto la apoptosis como la autofagia, ambos procesos involucrados en la muerte celular, se encuentran presentes en el parénquima de testículos de gallos reproductores y ambos fenómenos están fuertemente asociados entre sí.

6.- PERSPECTIVA

Con base en lo mencionado anteriormente sería de interés realizar otro estudio con gallos de más de 55 semanas de edad para observar posibles cambios. Y continuar con las investigaciones de la asociación encontrada entre la apoptosis y la autofagia en la regresión testicular ya que es importante comprender mejor la correlación encontrada.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Acevo P. (2017). Análisis del papel de la autofagia en el desarrollo del tubo neural del ratón. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Aguayo O. (2016) Diagnostico histopatológico e inmunohistoquímico de agentes virales involucrados en el complejo respiratorio porcino en el caso de campo. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Aránguiz P, Contreras A, Rojas D, et al. (2006). Autofagia del cardiomiocito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular?, Revista Chilena de Cardiología, 25 (3). 331-338.

Asano A, Tajama A. (2017) Development and Preservation of Avian Sperm. Avian Reproduction, 1001:59-73. doi 10.1007/978-981-10-3975-1_4.

Avila, E. et al., (2018). Introducción a la zootecnia del pollo y la gallina. México: UNAM. Pág 230.

Barrie G. (2007) Jamieson Reproductive Biology and Phylogeny of Birds. Queensland (Australia): Science Publisher.

Boya P. (2017). "Autofagia en la fisiopatología de los organismos", *Autofagia: cómo nuestras células se reciclan*. SEBBM, doi:[http://dx. doi.org/10. 18567/sebbm div ANC.2017.01.2](http://dx.doi.org/10.18567/sebbm-div-ANC.2017.01.2)

Brugère, J. et al. (2015). *Manual de patología aviar*. Paris: AFAS. Pág.14

Canela L. (2018). Factores que pueden afectar el desarrollo testicular y la fertilidad del gallo reproductor. *aviNews*. [En Línea]. México, disponible en: <https://avicultura.info/download/gallo-reproductor.pdf>. [Accesado 11 agosto 2013]

Cereceda K. (2012) *Cloruro de litio induce autofagia en células del túbulo seminífero*. Tesis de licenciatura. Valdivia (CI): Universidad Austral de Chile.

Chen J, Wang J. et al. (2016) Mechanisms of Heshouwuyin in regulating apoptosis of testicular cells in aging rats through mitochondrial pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16:337. doi 10.1186/s12906-016-1323-6

Cobb. "Guía de Manejo de Reproductoras". (2008) [En Línea], disponible en: <https://cobbstorage.blob.core.windows.net> [Accesado 16 de septiembre del 2019].

Costas M. (2017). "Autofagia, una estrategia de supervivencia celular", [En Línea], disponible en: [https://www.medicinabuenaaires.com/volumen-77-ano-2017/volumen-77-ano-2017-no-4-indice/autofagia-una-estrategia-de-supervivencia-celular/77\(4\):314-32](https://www.medicinabuenaaires.com/volumen-77-ano-2017/volumen-77-ano-2017-no-4-indice/autofagia-una-estrategia-de-supervivencia-celular/77(4):314-32). [Accesado 28 de septiembre del 2019].

De Dios M, (2018). *Guía de Inmunohistoquímica para técnicos*. [En Línea], disponible en: [http://www.msal.gob.ar /images/stories/bes/graficos/ 000001339cnt-20180921-guia-inmunohistoquimica-para-tecnicos.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/000001339cnt-20180921-guia-inmunohistoquimica-para-tecnicos.pdf). [Accesado 28 de septiembre del 2019].

Dirección de investigación y evaluación económica sectorial, (2019). *Perspectivas 2019*. [En Línea], disponible en: [https://www.fira.gob.mx/In vYEva IEcon / E v aluacionIF](https://www.fira.gob.mx/In-vYEva-IEcon/EvaluacionIF). [Accesado 22 de octubre del 2019].

FIRA, (2019). Cierre de la producción en México 2018 de carne de pollo. [En Línea], disponible en: <https://www.fira.gob.mx/InvYEvalEcon/EvaluacionIF> . [Accesado 22 de octubre del 2019].

Gallegos A, (2019). Efecto de la N- acetilcisteina sobre la bioenergetia mitocondrial en el daño renal inducido por acido folico. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

González C. Muscarse I, Vitullo, A. (2018). The balance between apoptosis and autophagy regulates testis regression and recrudescence in the seasonal-breeding South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*. PLOS ONE, 13(1):1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0191126.

González M, Soria E. (2010). Changes in the tubular compartment of the testis of *Gallus domesticus* during development. British Poultry Science, 51(2):296-307. doi: 10.1080/00071661003745836.

Hayat M. (2013) Autophagy, Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging. Alemania: EISEVIER. Pág. 2-11.

Hernandez S. (2018). Proceso de la apoptosis y su papel en el lupus eritematoso sistémico. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México

Horst E, Rüdiger K, Hans G. (2016) Avian Anatomy, Textbook and colour atlas. 2a. ed. Alemania: 5mpublishing.

Jiménez R., Burgos M, Barrionuevo F. (2015). Circannual Testis Changes in Seasonally Breeding Mammals. Sexual Development. 2015; 9(4), 205–215. doi:10.1159/000439039

Johnson M, (2018). Controles de carga en experimentos de western blot. [En Línea], disponible en: <http://www.labome.es/method/Loading-Controls-for-western-Blots.html>. [Accesado 1 de octubre del 2019].

Kant K, Ali A, Rajender S. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. Frontiers in Bioscience, E4(2), 746–754. doi:10.2741/e415

Klionsky, (2003). Autophagy. Landes Bioscience. Estados Unidos: Landes bioscience. Pág. 287-299.

Kumar V. (2014). Patología Humana. 7a ed. España: Elsevier. Pág.27.

Liu, X., Zhang, L. et al. (2013). Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks. Food and Chemical Toxicology, 60: 168–176. doi:10.1016/j.fct.2013.07.058

Málaga Y, Ortiz D, Hernández I, et al. (2005). Detención de la espermatogénesis. [En Línea], disponible en: 2005;73:500-8.<https://pdfs.semanticscholar.org/c7fe/0315be8949825d1256b19dbb61b3208be883.pdf> [Accesado 17 de septiembre del 2019].

Martín I, García T. (2012). Atlas de Inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales. España: Diaz de Santos.Pág. 3-5.

Martínez Z. (2017). Activación temprana de la autofagia en respuesta al daño del DNA ocasionado por Irinotecan en células de mamíferos. Tesis licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Massoud D, Lao-Peréz M, Hurtado A, et al. (2018). Germ cell desquamation-based testis regression in a seasonal breeder, the Egyptian long-eared hedgehog, *Hemiechinus auratus*. PLOS ONE, 13(10):1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204851>.

“Manual de suplementos sobre manejos de aves reproductoras Cobb 500”. (2019). [En Línea], disponible en: <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/a5d48c85f1/1129d730-6612-11e9-bfbd-7963ec6b06e5.pdf>. [Accesado 16 de septiembre del 2019].

Milton I. (2015). “Manejo de la técnica de western blot. Determinaciones relacionadas con obesidad y diabetes”. [En Línea], disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/15183/TFM_MiltonLaskibar%20I.pdf?sequence=1. [Accesado 28 de septiembre del 2019]

Morales E, et al. (2007). Apoptosis and Molecular Pathways in the Seminiferous Epithelium of Aged and Photoinhibited Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology*. 28 (1): 123–135, doi.10.2164/jandrol.106.000778.

Najafov A, Hoxhaj G. (2017). *Western Blotting Guru*. Estados Unidos: ELSEVIER. Pág. 1-2.

Nyvik S, Hamarsland H et al. (2019). The impact of age and frailty on skeletal muscle autophagy markers and specific strength: A cross-sectional comparison. *Experimental Gerontology*, 110687: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110687>.

Pérez L. (2013). Efecto de las aflatoxinas sobre aspectos fisiológicos y morfológicos reproductivos en gallos (*gallus gallus*) así como el efecto detoxificador de la vitamina c sobre los mismos. Tesis doctorado. Universidad de Córdoba.

Ramírez A, Aleman L, Villa M. (2016). Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro, *Revista Chilena de Cardiología*, 35(3): 228-241.

Ross M. (2008). *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª ed. Buenos Aires: Medica panamericana.

Sader (2018). Atlas agroalimentario carne de pollo. [En Línea], disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018 [Accesado 28 de septiembre del 2019]

Sarabia F, Pizarro D, Abad M, et al. (2012). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels. *Reprod Domest Anim*,48(2): 345-52. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02161.x

Sosa R. (2019). Catedra de bioquímica-apoptosis. Facultad de Medicina. [En Línea], disponible: <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf>. [Accesada 14 de Septiembre].

“Suplemento del macho reproductor Cobb MV”. (2017), [En Línea], disponible en: <https://cobbstorage.blob.core.windows.net/guides/607bf3a0-0ac2-11e9-9c88-c51e407c53ab> [Accesado 16 de septiembre]

Torlakovic E, Nielsen S, et al. (2015). Getting controls under control: the time is now for immunohistochemistry. *BMJ*, 0:1-4 doi: 10.1136/jclinpath-2014-202705

UNA, (2018). “Compendio de indicadores económicos del sector avícola”, [En línea]. México, disponible en: <http://www.una.org.mx/>. [Accesado el día 08 de junio del 2019]

Velázquez M. (2004). “Smac/diablo y su papel en la regulación de la apoptosis”, *REB*, 23 (2):64-70.

Xu, X., Hua, Y., Sreejayan, N., et al., 2013. Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 61–63.

Yang P, Mahmood T. (2015). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *Journal of Medical Sciences*, 4(9): 429-434. doi: 10.4103/1947-2714.100998

Zhang, M., Jiang, M., Bi, Y., Zhu, H., Zhou, Z., & Sha, J. (2012). *Autophagy and Apoptosis Act as Partners to Induce Germ Cell Death after Heat Stress in Mice Plos ONE*, 7(7), e41412. doi:10.1371/journal.pone.0041412

ANEXOS

Anexo A. Soluciones

Preparación de gel separador y concentrador al 15 %

Gel Separador	1 Gel	Gel concentrador	1 Gel
H2O	.55 ml	H2O	1 ml
Tris; pH 8.8	2.2 ml	Tris; pH 6.8	1.25 ml
Acrilamida	2.75 ml	Acrilamida	0.45 ml
TEMED (tetrametilen diamina)	5 µl	TEMED (tetrametilen diamina)	2.5 µl
APS (persulfato de amonio)	50 µl	APS (persulfato de amonio)	12.5 µl

Anexo B. Estadístico.

Promedio y dispersiones (Unidades Normalizadas)

EDAD (SEMANAS)	CASPASA-3 PROM ± DE (n)	LC3-1 PROM ± DE (n)	LC3-II PROM ± DE (n)
26	1.00 ± .45 (10)	1.00 ± .39 (10)	1.00 ± .26 (10)
33	1.19 ± .48(10)	0.78 ± .26 (10)	0.69 ± .27 (10)
55	1.32 ± .82 (9)	1.06 ± .62 (9)	1.00 ± .61 (9)

Al observar los datos detenidamente y realizar algunas pruebas de detección de valores atípico, se concluyó que la observación con identificación 3V2 (3= número de grupo (55 semanas), V= color de identificación verde, 2= gallo 2 de ese grupo), era un valor atípico, por lo que se decidió excluir de los análisis quedando una n=9.

Anexo C. Protocolo de IHQ caspasa-3

Desparafinación:

En horno a 60 °C durante 30´.

Xilol	10 pases
Alcohol absoluto	10 pases
Alcohol al 96 %	10 pases
Alcohol al 80 %	10 pases
Alcohol al 70 %	10 pases
Agua destilada	10 pases

Lavado con agua destilada, un cambio de 5´

Recuperador de antígenos:

Colocar las laminillas en solución a pH bajo (diluir 1:10 en agua destilada) en un vaso de coplin de plástico cerrado dentro de una olla de presión con agua destilada a 1/5, durante 10´.

Liberar presión, abrir y atemperar durante 20´.

Lavado con PBS, un cambio de 5´.

Bloqueo de Peroxidasa:

Peróxido de hidrogeno + agua destilada en relación 1:5 durante 10´ a temperatura ambiente.

Lavado con PBS, un cambio de 5´.

Bloqueo de inmunoglobulinas:

Agregar 50µl de Background Sniper, y incubar en una cámara húmeda durante 7´ a temperatura ambiente.

Lavado con PBS un cambio de 5 minutos.

Incubación con el anticuerpo primario

Agregar 50µl del anticuerpo primario anti-caspasa-3 dilución 1:100 e incubar en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.

Lavado con PBS, un cambio de 5´.

Incubación con el anticuerpo secundario

Anexo D. Modificaciones al protocolo de LC3B

Se llevó a cabo el mismo protocolo que para caspasa-3 modificando

Dilución	Tiempo Recuperador de antígenos	pH	Tiempo incubación Anticuerpo primario	Tiempo Revelado	Órganos control	Observaciones
1:50 1:100	10´	Bajo	Toda la noche	1´		Marcaje inespecífico (nuclear)
1:200	10´	Bajo	Toda la noche	1´		Marcaje inespecífico (nuclear)
1:400 1:800	10´	Bajo Alto	1 hora: 1:400 Toda la noche 1:800	1´	Corazón , musculo , cerebro, hígado y testículo .	1:400 marcaje inespecífico (nuclear) 1:800 desapareció marcaje
1:50 1:100	30´	Bajo Alto	Toda la noche	1´		Marcaje inespecífico (nuclear)
1:100 1:200	20´	Bajo Alto	Toda la noche	pH Alto 1´ pH Bajo 50´´	Testículo gallo 55 sem	Marcaje inespecífico (nuclear)
1:400 1:800	20´	Bajo Alto	Toda la noche	pH Alto 40´´ pH bajo 1´	Testículo gallo 55 sem.	Marcaje inespecífico (nuclear)
1:1600 1:3200	20´	Alto	Toda la Noche	pH Alto 1:1600 1´ 1:3200 1´30´´	Testículo gallo 55 sem.	Marcaje inespecífico (nuclear)

Anexo E. Requerimientos nutricionales. Tomados del Manual de suplementos sobre manejos de aves reproductoras Cobb 500.

Fase	Energía Metabolizable Kcal	% Proteína
Iniciación	2850	19
Crecimiento	2700	14
Desarrollo	2800	15
Producción Macho	2700	13

Anexo F. Pesos estándar. Tomado de Suplemento de macho reproductor Cobb

Edad	Peso promedio Gallos Prueba Kg	Peso estándar Kg
26 semanas	3.749	3.690
33 semanas	4.312	4.110
55 semanas	4.493	4.610