

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *Timosina* β -10
EN MACRÓFAGOS BOVINOS INFECTADOS CON
Mycobacterium bovis

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
SILVIA MARÍA ESPINOSA MARTÍNEZ

TUTOR:
DR. JOSÉ ÁNGEL GUTIÉRREZ PABELLO

CÓMITE TUTORAL:
DRA. IRIS ESTRADA GARCÍA
DR. ROGELIO ALONSO MORALES

MÉXICO, D. F.

2005

m 345663



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.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



Silvia María Espinosa Martínez

DEDICATORIA

Por todo el tiempo que le dediqué a este proyecto
y que dejé de disfrutarlo contigo.
Por todos los reproches que me hacías
cada vez que tenía que dejarte.
Por todas las veces que me preguntabas
cuando iba a terminar.
Por el gran sacrificio que significó para ti y para mí.
Con todo mi amor y porque eres lo más importante en mi vida,
Te AMO y que Dios te bendiga hoy y siempre... Emilio.

Por el apoyo que me dieron en todos los aspectos
Porque sin ello no habría podido llegar hasta el final...
Silvia y Mache, va por ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES,

Por el apoyo económico y moral tanto hacia mi persona como hacia ese pedacito de mí... Emilio, los AMO y siempre les estaré agradecida.

A EMILIO,

Por todo lo que sufriste por no tenerme a tu lado, por hacer un esfuerzo por entenderme, porque quiero ser un ejemplo para que te sientas orgulloso de mí... Te AMO hijo.

A MIS HERMANAS,

Leslie, por el apoyo, por escucharme, por quererme y Alma, por ser ese ángel que me cuidó desde el cielo y también me ayudó en los momentos difíciles... Gracias y las AMO.

A DANIEL,

Porque llegaste a mi vida en el momento justo, por todo el apoyo y amor que me has brindado... Muchas Gracias AMOR.

A MI TUTOR,

Dr. José Ángel, por aceptarme, apoyarme y creer en mí.

A MIS AMIGOS del LABORATORIO,

Irasema, Alejandro, Hugo, Xóchitl, Elihú, Toño y Giovanna, porque cada uno de ustedes fue mi maestro, de cada uno aprendí en lo profesional y en lo personal, porque me llevo una lección de vida... GRACIAS.

A MIS AMIGOS del DEPTO. de MICROBIOLOGIA e INMUNOLOGIA,

Lupita, Erika Carrillo, Rosalba, Sra. Ma. Luisa, Julio, Mari Toña, María e Isabel, aunque no pertenecían al Depto. pero como si lo fueran, a todos los miembros de los laboratorios de Microbiología Molecular, de Leptospirosis, de Micología, de Diagnóstico Bacteriológico, del área de preparación de medios (La Cocina), porque, en su momento, de cada uno de ustedes recibí algo que me permitió estar hoy aquí.

AL COMITÉ TUTORAL,

Dra. Iris Estrada García y Dr. Rogelio Alonso Morales, por todas sus aportaciones y sugerencias para poder llevar a cabo el proyecto.

A TODA MI FAMILIA,

En especial mis tíos: Chucho y Columba, así como mi prima Columba, por abrirme las puertas de su casa y principalmente por acogerme en su familia... MUCHAS GRACIAS.

A DIOS,

Porque no permitió que perdiera la fe, porque me permitió vivir y aprender.

RECONOCIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación de Tuberculosis Bovina del Departamento de Microbiología e Inmunología así como en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Inicialmente, por autorización de la Dra. Iris Estrada García, se utilizó el termociclador para Tiempo Real ubicado en el Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Nacional Politécnico, con ayuda y asesoría por parte del Dr. Rommel Chacón Salinas.

Por el apoyo brindado por parte del Cor. M.C. Ramón Arturo Valdés Espinosa Sub Director de Investigación, en el uso de las instalaciones así como del equipo para medir en Tiempo Real de la Escuela de Graduados de Sanidad perteneciente a la Escuela Médico Militar, con ayuda y asesoría del Tte. Alejandro Incháustegui.

Esta tesis fue financiada por los proyectos:
CONACYT 34833-B
PAPIIT IN 219999
PAPIIT IN 237002-3

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1.0 INTRODUCCIÓN	3
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.0 RESULTADOS	19
4.0 DISCUSIÓN	29
5.0 CONCLUSIONES	33
6.0 REFERENCIAS	34
7.0 ANEXOS	40

INDICE

1.0	INTRODUCCIÓN.....	3
	Hipótesis.....	11
	Objetivo General.....	11
	Objetivos Específicos.....	11
2.0	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1	Microorganismos.....	12
2.1.1	Obtención del Inóculo.....	12
2.1.2	Determinación de unidades formadoras de colonias del inóculo.....	13
2.2	Macrófagos Bovinos.....	13
2.2.1	Aislamiento de monocitos a partir de sangre venosa periférica.....	14
2.2.2	Cosecha de macrófagos.....	15
2.2.3	Infección de macrófagos.....	16
2.3	Extracción de RNA.....	16
2.3.1	Cuantificación.....	16
2.3.2	Electroforesis.....	17
2.3.3	Purificación del RNA.....	17
2.4	RT-PCR.....	17
2.4.1	Iniciadores para PCR.....	17

2.4.2	Síntesis de cDNAs.....	17
2.4.3	Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT).....	18
2.4.4	Análisis de resultados.....	18
3.0	RESULTADOS.....	19
3.1	Ensayo de protección de ribonucleasas (RPA).....	19
3.2	Expresión del gen <i>Timosina</i> β -10 en macrófagos bovinos: RT-PCR en tiempo real.....	19
4.0	DISCUSIÓN.....	29
5.0	CONCLUSIONES.....	33
6.0	REFERENCIAS.....	34
7.0	ANEXOS.....	40
7.1	Preparación de la suspensión de percoll de trabajo.....	40
7.2	Extracción de RNA.....	42
7.3	Purificación de RNA.....	43
7.4	Transcripción reversa.....	44
7.5	Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
7.6	Curvas de Disociación.....	45
7.7	Resultados método comparativo de C_t	46
7.7.1	Vaca 47.....	46
7.7.2	Vaca 99.....	48

7.7.3	Vaca 117.....	50
7.7.4	Vaca 98.....	52
7.7.5	Vaca 75.....	54
7.7.6	Vaca 130.....	56
7.8	Resultados Análisis Estadístico.....	58
7.8.1	T-test vaca 75.....	58
7.8.2	T-test vaca 47.....	61
7.8.3	T-test vaca 130.....	63
7.8.4	T-test vaca 117.....	66
7.8.5	T-test vaca 98.....	67
7.8.6	T-test vaca 99.....	71
7.9	Resultados del método comparativo de C_t (Réplicas Biológicas).....	75
7.9.1	Vaca 47.....	75
7.9.2	Vaca 99.....	77
7.9.3	Vaca 117.....	79
7.9.4	Vaca 98.....	81
7.9.5	Vaca 75.....	83
7.9.6	Vaca 130.....	85

RESUMEN.

Silvia María Espinosa Martínez. Expresión diferencial del gen *Timosina* β -10 en macrófagos bovinos infectados con *Mycobacterium bovis*.

Bajo la dirección del Dr. José Angel Gutiérrez Pabello.

Se sabe que tanto la función celular normal como la patológica son conducidas por cambios en la expresión génica y que ciertos microorganismos infecciosos, particularmente parásitos intracelulares, modulan la expresión de algunos genes del hospedero como un mecanismo de supervivencia. Del mismo modo, la infección intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino, los induce a morir por apoptosis además de inducir la sobreexpresión del gen *Timosina* beta-10. Este gen codifica para una proteína del mismo nombre involucrada en regular la polimerización de actina, además se le implica en el crecimiento y diferenciación celulares. Por otra parte, se considera que la regulación del gen por *M. bovis*, depende de cada individuo, por lo que el objetivo del presente estudio fué medir en macrófagos de diferentes bovinos, la expresión de *Timosina* beta-10 como consecuencia de la infección con *M. bovis*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los resultados mostraron una expresión de *Timosina* beta-10 dependiente del individuo, del tiempo, así como de la cepa que fué utilizada para la infección. A pesar de ello, no se puede concluir que el proceso de apoptosis ocurrido por la infección con *M. bovis* este asociado con la expresión del gen ya que en ningún caso se observó alguna tendencia que pudiera relacionar ambos eventos. Sin embargo, todavía no se puede descartar que *Timosina* beta-10 juegue algún papel dentro de la patogenia de la tuberculosis bovina.

SUMMARY.

Silvia María Espinosa Martínez. Differential expression of *Thymosin* beta-10 gene in bovine macrophages infected with *Mycobacterium bovis*.

Directed by Dr. José Angel Gutiérrez Pabello.

It is well known that both normal and pathological cellular functions are conducted by changes in gene expression and that certain infectious microorganisms, characteristically intracellular parasites, modulate the expression of some host genes as a survival mechanism. *Mycobacterium bovis* infection induces bovine macrophages to undergo apoptosis as well as *Thymosin* beta-10 gene overexpression. *Thymosin* beta-10 gene encodes a protein of the same name that regulates actin polymerization and is involved in cellular growth and differentiation. Based on previous results, it has been hypothesized that macrophage *Thymosin* beta-10 gene regulation by *M. bovis* is individual dependent, therefore the main purpose of the present study was to measure *Thymosin* beta-10 gene expression in *M. bovis*-infected bovine macrophages from different donors using the real-time polymerase chain reaction. The results demonstrated that *Thymosin* beta-10 expression was not only individual-, but also time- and strain- dependent. Further investigation is needed to address the association of *Thymosin* beta-10 expression with apoptosis induction in macrophages of the same donors.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial ya que es la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, con una mortalidad aproximada de 3 millones de personas cada año (3,37).

Cerca de un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo de tuberculosis y cada año, 10 millones de personas en el mundo adquieren la enfermedad, por esto se le ha dado una gran importancia como problema de salud pública (6).

La tuberculosis es causada por diferentes especies de bacterias que forman parte del complejo Tuberculosis: *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y ***Mycobacterium bovis***, siendo este último el agente causal de la tuberculosis bovina (7,39).

De los 3 millones, aproximados, de personas que mueren anualmente por tuberculosis, del 5 al 10%, dependiendo del país, son infectados por *Mycobacterium bovis*, de hecho, los datos de un estudio en la región de Baja California, demostraron la presencia de esta especie en el 33.9% de los niños infectados, los cuales desarrollaron principalmente lesiones digestivas. Esta micobacteria tiene una amplia gama de hospederos como son los bovinos, caprinos, ovinos, porcinos, aves, caninos, felinos, otros mamíferos silvestres, así mismo el hombre, por lo que se considera una zoonosis. La enfermedad causa pérdidas económicas principalmente, porque en los animales afectados la producción de leche disminuye hasta un 17%, además de que es causa del decomiso parcial o total de las canales de animales infectados, esto según la NOM-031-ZOO-1995 (14,36,39,51).

La interacción entre el hospedero y el agente patógeno durante la enfermedad puede considerarse como un campo de batalla dinámico donde el microorganismo para sobrevivir dentro del hospedero, se tiene que enfrentar con las formidables defensas del sistema inmune.

Dentro de estas defensas encontramos a los macrófagos (M ϕ), que son las células que juegan un papel crítico en la respuesta inmune innata del hospedero en contra de la infección causada por patógenos, de esta manera, la primer célula que entra en contacto con *Mycobacterium spp* es el M ϕ .

El M ϕ es la célula mayormente diferenciada del sistema fagocítico mononuclear, este sistema consta de monoblastos, promonocitos y monocitos de médula ósea, monocitos de sangre periférica y M ϕ de tejidos. El M ϕ se origina en la médula ósea dentro

de la cual encontramos tres tipos diferentes de células: monoblastos (células que dan origen a los promonocitos), promonocitos (de los que se derivan los monocitos) y monocitos, estos últimos salen de médula ósea, migran a través de la sangre periférica a tejidos extravasculares donde finalmente logran su maduración a M ϕ . Los M ϕ generalmente se localizan en órganos linfoides, hígado, pulmones, tracto gastrointestinal, Sistema Nervioso Central, cavidades serosas, huesos y piel, participando en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos como la protección del hospedero al fagocitar cuerpos extraños y secuestrarlos dentro de estructuras denominadas fagosomas para su posterior destrucción; la presentación de antígenos; y la remodelación de los tejidos en el proceso inflamatorio (5).

En general, los M ϕ tienen receptores de superficie que determinan el control de actividades tales como: crecimiento, diferenciación, activación, reconocimiento, endocitosis, migración y secreción. Dentro de los receptores reconocidos en los M ϕ y que están vinculados con *M. tuberculosis* se encuentran: receptores del Complemento (C) (CR1, CR3 y CR4), receptores de Fc y receptores de manosa entre otros (5, 34).

Los efectos derivados de la fagocitosis varían dependiendo del receptor que sea utilizado, por ejemplo, cuando esta ocurre a través de los receptores de Fc, el estallido respiratorio en el M ϕ se ve aumentado mientras que con los receptores del C tienen un efecto opuesto. El tipo más común de fagocitosis dada cuando el M ϕ entra en contacto con *M. tuberculosis* no es mediante opsoninas, sino por el reconocimiento de residuos terminales de manosa que se encuentran en la partícula blanco y que son reconocidas por los receptores de manosa presentes en el M ϕ . Estos receptores de manosa participan en la fagocitosis evitando la producción de oxígeno, es decir, inhiben el estallido respiratorio, y retrasan la maduración del fagosoma a lo largo del camino endosomalisosomal (4).

La expresión de dichos receptores está regulada por diferentes mediadores, por ejemplo, el IFN- γ , disminuye la expresión de los receptores pero al mismo tiempo aumenta la expresión de los receptores de Fc por lo que la célula en teoría aumenta su capacidad para eliminar al microorganismo; la IL-4, por el contrario, disminuye la expresión de los mismos (45).

Por otro lado, se sabe que las especies del género *Mycobacterium* son parásitos intracelulares facultativos capaces de producir tanto una enfermedad progresiva como una infección latente asintomática a pesar de una productiva respuesta inmune mediada por células (B). La infección por dicho microorganismo, generalmente se divide en tres

estados separados pero a la vez interrelacionados. En el primero ocurre la infección por inhalación del bacilo, siendo en la mayoría de los casos controlada por el sistema inmune. Solo el 10% de las infecciones resultan en el progreso de la enfermedad. Una vez dentro de los pulmones, primeramente infecta y permanece en células fagocíticas residentes o, alternativamente, en monocitos reclutados de la sangre periférica logrando, en el caso de especies patógenas, sobrevivir al hábitat hostil del M ϕ mediante diferentes mecanismos que incluyen: la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma y en consecuencia, la acidificación del fagosoma; la interferencia de la producción de reactivos intermediarios de O₂ y N₂, es decir, impiden el estallido respiratorio; y la modulación de la apoptosis. Algunas bacterias permanecen en un estado latente dentro del hospedero por un periodo muy largo, durante el cual no presentan replicación o es sumamente lenta (3,6,30,54).

El segundo, está básicamente determinado por la respuesta inmune del hospedero, es decir, si el individuo se encuentra inmunocomprometido al entrar en contacto con la micobacteria, la infección se establecería como aguda, caracterizada por la proliferación bacilar descontrolada y la diseminación del microorganismo a sitios distales. Por otra parte, si el individuo es inmunocompetente, su sistema inmune logrará resolver la infección inicial o, alternativamente, mantener la infección con el fin de emplear mecanismos que prevengan la futura proliferación bacilar, limitando la diseminación del mismo y concentrando la respuesta inmunológica en sitios determinados de la infección.

El tercer y último estado de la infección se caracteriza por la reactivación del bacilo del estado de latencia en que se encuentra y en consecuencia, el inicio de una segunda infección aguda en el hospedero. Los mecanismos responsables para que esta transición ocurra, no están del todo claros (54).

Actualmente, gracias a la biología molecular se ha reconocido que el curso en el desarrollo normal así como los cambios patológicos que surgen en algunas enfermedades, son conducidos por cambios en la expresión de ciertos genes. Así, mediante algunas investigaciones, se ha identificado que algunos microorganismos infecciosos, particularmente parásitos intracelulares, tienen alguna influencia en modular la expresión de ciertos genes en el hospedero, lo cual puede ser utilizado como un mecanismo patogénico para sobrevivir. En el caso de *M. bovis*, se ha visto que los M ϕ bovinos infectados con esta bacteria, presentan una modificación en la expresión del gen *Timosina* β -10. Este gen codifica para una proteína del mismo nombre involucrada en la regulación de la polimerización de otra proteína conocida como actina (21).

La actina es una proteína abundante, altamente conservada que se polimeriza en filamentos que son esenciales para varias formas de motilidad celular, incluyendo contracciones musculares, al igual que la estructura y propiedades mecánicas de la matriz citoplásmica (12,16).

El total de la reserva de actina en las células está compuesta de filamentos de actina polimerizada (F-actina) y de actina globular (G-actina), es decir, monómeros o actina no polimerizada. Solo una pequeña fracción de la actina no polimerizada, en las células, es verdaderamente "actina libre", no relacionada con otras proteínas (12,16,18).

Cada monómero contiene un nucleótido (adenina-ATP) con el que está vinculado. El nucleótido en la actina monomérica puede intercambiarse con aquellos que están en el medio. La concentración de ATP libre presente es 10 veces mayor que la de ADP y, bajo condiciones fisiológicas, la actina monomérica tiene una afinidad ligeramente mayor por el ATP que por el ADP. Después de la polimerización, el ATP vinculado a esta molécula es rápidamente hidrolizado en ADP y P. Los monómeros de actina-ADP tienen una afinidad menor por las porciones terminales de los filamentos que la actina-ATP; una concentración más elevada de ADP- que de ATP-actina se requiere para la polimerización de cualquier porción terminal del filamento (12,16,18).

El citoesqueleto de actina en las células no musculares responde a estímulos extracelulares a través de una serie de reacciones, temporalmente reguladas y espaciadas, de polimerización y despolimerización. Después de la polimerización, los filamentos de actina son transportados centripetamente y posteriormente son despolimerizados. Las subunidades de actina recién liberadas son capturadas por proteínas que se les unen y son recicladas hacia el frente de la célula (46, 47).

Un rasgo fascinante de la locomoción de las células es que la polimerización de la red de actina y su despolimerización ocurren simultáneamente en diferentes lugares del citoplasma, mientras que las concentraciones totales de la actina polimerizada se mantienen aproximadamente constantes. La polimerización de la red ocurre primeramente al frente de la célula y su despolimerización, dependiendo del tipo de célula, se lleva a cabo en todas partes o atrás de la laminilla. Una célula puede mantener índices elevados de polimerización así como despolimerización de la red simultáneamente probablemente debido a distintas propiedades de las moléculas de actina conteniendo diferentes intermedios de hidrólisis de ATP; a los efectos de las proteínas que se unen a monómeros o filamentos de actina; y, a la distribución espacial de la actina monomérica, las proteínas unidas a actina, y sus moduladores en la célula (12,16,18).

Muchas de las células eucarióticas contienen elevadas concentraciones de actina monomérica. En un fibroblasto, aproximadamente el 50% de esta proteína se encuentra en filamentos y el otro 50% está en monómeros. Los niveles tan elevados en fibroblastos y M ϕ , sugieren una relación con la motilidad o adhesión. La concentración de monómeros es típicamente 50-200 μ M (2-8 mg/ml) en una gran variedad de tipos celulares; estos números son sorprendentemente elevados dadas las críticas concentraciones tan bajas que hay de actina pura (menos de 1 μ M); esto refleja la presencia de proteínas especiales que se unen a esta molécula e inhiben su adición a la porción terminal de los filamentos de actina (2, 38).

Muchas de las proteínas que se unen a los monómeros de actina ya han sido descritas y está claro de que dichas proteínas tienen propiedades comunes así como únicas. Dentro de éstas encontramos 3 pequeñas familias: profilinas, timosinas β y el factor de despolimerización de actina (ADF)/ Cofilin (42, 46).

Originalmente se pensaba que la profilina era la principal proteína secuestradora de actina pero no está presente en cantidades suficientes para poder cubrir más de una parte de los niveles de actina monomérica observados en la célula. Fue entonces cuando se descubrió un péptido de 5kD, secuestrador de dicha proteína, presente en grandes concentraciones en plaquetas de humanos, que parecía ser idéntico a un péptido previamente identificado en el sistema inmune de ratas. Originalmente se pensaba que era la hormona del timo, por lo que se le dio el nombre de timosina (37).

Las timosinas β son las proteínas más pequeñas identificadas a la fecha y con la capacidad de unirse a monómeros de actina. Incluso el último residuo de aminoácido en la porción C-terminal de dichas proteínas está involucrado en la interacción con G-actina (46).

Al analizar la secuencia de todas las timosinas se identificó que estas contienen la secuencia de un hexapéptido similar a la que tiene la actobindina, la cual contiene una lisina que puede entrecruzarse con actina. El hexapéptido de la actobindina, LKHAET, por sí solo inhibe la polimerización de la actina. En general, la secuencia de todas las timosinas está bien conservada lo que sugiere que el secuestro de la actina es probablemente una propiedad de todas las timosinas β (20,38).

Se han descrito varias isoformas de estas proteínas como: timosina β -10 y timosina β -9 que coexisten con la timosina β -4 y comparten un alto grado de homología con ella, aunque tienen diferentes patrones de expresión específicos de tejido y del desarrollo. En particular, timosina β -4 y timosina β -10, se han identificado como proteínas

secuestradoras de monómeros de actina. Una cinética de la interacción de timosina con actina, junto con otros estudios, apoya la hipótesis de que la función principal de estas proteínas es la de actuar como un amortiguador para G-actina (19,46,53).

Por todo lo anterior, las timosinas β son los candidatos favoritos para mantener la gran reserva de monómeros de actina en las células vivas, aunque no está totalmente claro como es que esta proteína actúa sobre dicha molécula, se han considerado dos posibilidades: podría bloquear completamente la polimerización cubriendo un sitio donde un monómero se une a otro; o bien, atrapar el ADP en la actina mediante la inhibición del intercambio ATP-ADP, lo que hace que esta última tenga una estructura diferente y por consiguiente no pueda polimerizarse (2, 38, 47,53).

Específicamente la timosina β -10 muestra un 70% de homología con respecto a la timosina β -4 y está compuesta por 43 residuos de aminoácidos con una acetil-alanina en la porción N-terminal (1).

Esta isoforma, timosina β -10, es expresada en la mayoría de los tejidos de los mamíferos, estando distribuida dentro del citoplasma de diferentes tipos celulares. Durante la embriogénesis el control de la polimerización de actina es esencial en procesos tales como la migración celular, angiogénesis y neurogénesis. Durante el desarrollo cerebelar de la rata se han observado patrones complejos de expresión de la timosina β -10. Su expresión *in vivo* es inicialmente elevada en células granulares inmaduras y va disminuyendo conforme éstas migran y se van diferenciando, terminando todos al mismo tiempo para el día 21 post-nacimiento. La timosina β -10 está presente en bajas cantidades y en una pequeña subpoblación de células de la glía en el cerebelo del adulto. Esta isoforma tiene su desarrollo regulado en el cerebro, siendo expresado en niveles mayores durante el desarrollo temprano, es decir, en tejido embrionario de mamíferos, que en animales maduros y es modulado por el morfogén del ácido retinóico (13,24,28,33,50).

El gen que codifica para esta proteína se localizó mediante fluorescencia en un análisis de hibridación *in situ* en el cromosoma 2q37 del humano (10).

Se ha observado que la expresión diferencial de este gen tiene influencia en la morfología, crecimiento y diferenciación celulares. A las células que sobreexpresan la proteína se reduce su índice de crecimiento y/o crecen en una forma desorganizada, por lo que se les ha implicado en el progreso de tumores. Se analizó la expresión del RNAm de *Timosina* β -10 en determinados tejidos encontrando una asociación a metástasis de varias líneas celulares de melanomas humanos en ratones. Además de ser expresado en

lesiones melanocíticas humanas frescas, lo que permite pensar que la timosina β -10 pudiera ser un marcador para el nuevo desarrollo de un melanoma cutáneo humano. Se detectó en células cancerosas de 30 especímenes de tejido de glándula mamaria humana y también está expresado constitutivamente en niveles altos en neoplasias de riñón humano (22,23,25,26,29,31,32,49,52).

Por otra parte, también se ha reportado que la sobrerregulación de esta proteína predispone a las células a atravesar por un proceso de apoptosis. Al bloquear el gen parece que las células son dotadas con una robusta red de F-actina e induce resistencia a ambos tipos de muerte celular, espontánea e inducida por drogas, al tiempo que aumenta la habilidad de proliferación (26,27,31).

Considerando que uno de los mecanismos de defensa de *M. bovis* es el modular la apoptosis y que la sobreexpresión del RNAm de *Timosina* β -10 se ha asociado a eventos de apoptosis, se llevó a cabo un estudio utilizando como modelo biológico M ϕ de bovino, dichas células fueron infectadas tanto con cepa patógena como no patógena de *M. bovis*, demostrándose que la infección induce una sobrerregulación de varios genes, dentro de los cuales se encontró el RNAm que codifica para timosina β -10 al mismo tiempo que se midió apoptosis observándose una relación directamente proporcional, lo que les llevó a suponer una posible asociación entre ambos eventos (21).

Por otro lado, basándose en lo que se sabía acerca de la participación de *M. tuberculosis* en los eventos apoptóticos en M ϕ humanos y de ratón, se analizó el efecto que tiene la infección por *M. bovis* con respecto a la modulación de la apoptosis, en M ϕ derivados de monocitos de sangre venosa periférica bovina, procedentes de animales con fenotipo de resistencia y susceptibilidad a patógenos intracelulares. Al medir los niveles de apoptosis como consecuencia de la infección por *M. bovis*, se observó una mayor inducción de la misma en los M ϕ derivados del animal resistente comparado con los niveles detectados en los M ϕ susceptibles, lo que les llevó a pensar que la apoptosis detectada por la infección con *M. bovis*, es dependiente del fenotipo de cada individuo (17).

Tomando como referencia la participación tanto de timosina β -10 como de *M. bovis* en determinados eventos de apoptosis y para corroborar el tipo de intervención que desempeña este gen durante la infección por este agente, en el presente estudio se identificó el efecto que causa *M. bovis* en la expresión de *Timosina* β -10 al infectar M ϕ bovinos procedentes de diversos donadores con la idea de evaluar la variación entre los

individuos asociada a la expresión de este gen. Nuestro trabajo permitirá sentar las bases para la realización de los estudios correspondientes donde se logre identificar el papel específico que desempeña timosina β -10 dentro de los procesos de apoptosis derivados de la patogenia de la tuberculosis bovina.

HIPÓTESIS.

La expresión del gen *Timosina* β -10 en macrófagos bovinos infectados con *M. bovis*, tiene una variación dependiente del individuo.

OBJETIVO GENERAL.

Medir la expresión de *Timosina* β -10 en macrófagos bovinos infectados con *M. bovis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Cuantificar la expresión de *Timosina* β -10, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real, en macrófagos bovinos, provenientes de varios donadores, infectados con *M. bovis*.
2. Comparar el efecto de la virulencia de la cepa de *M. bovis* en la expresión de *Timosina* β -10 en macrófagos bovinos infectados.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 MICROORGANISMOS.

Se emplearon las cepas 9926 (patógena) de *M. bovis* y la subcepa Danesa (no patógena) de *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guerin).

La cepa Danesa fue amablemente donada por la Dra. Iris Estrada de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, mientras que la cepa 9926 se aisló de un animal sacrificado en septiembre de 1998, procedente de Acatic, Jalisco, el cual presentó lesiones sugestivas a tuberculosis.

2.1.1 OBTENCIÓN DEL INÓCULO.

Para la preparación de los inóculos, de cada una de las cepas se realizó, en estudios previos, una cinética de crecimiento bacteriano para establecer el día en el cual se alcanzaría la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

Cada una de las cepas se sembró en placas de agar Middlebrook 7H11 (Bacto, Difco Laboratories, Detroit MI, EUA) enriquecido con 10% de ácido oléico, catalasa y dextrosa (OADC) (BBL Middlebrook OADC Enrichment, Becton Dickinson, Sparks MD, EUA), cuando las colonias fueron visibles, después de 15-21 días, se tomaron 5 de ellas y se transfirieron a 30 ml de medio Middlebrook 7H9 (BBL Middlebrook 7H9 Broth Base, Becton Dickinson, Cockeysville MD, EUA) enriquecido con 10% de OADC y 0.5 g/L de Tween 80 (Sigma, St Louis MO, EUA) en tubos de polipropileno de 50 ml. Se incubaron por 8 días a 37°C con agitación constante de 100 revoluciones por minuto (rpm).

El cultivo obtenido se transfirió a 270 ml de medio Middlebrook 7H9 preparado en la forma ya descrita y se incubó en las mismas condiciones. A partir de este momento se consideró el tiempo inicial.

Cuando los cultivos de cada una de las dos cepas seleccionadas alcanzaron la fase logarítmica media de crecimiento (9926: 11-12 días; y, BCG: 4-6 días), se procedió a centrifugar el cultivo bacteriano a 2500 x Gravedades (xg) (Fuerza Centrífuga Relativa (RCF)= $1,12r^2$; donde: r =radio del rotor en mm; y, $n^2 = \text{RPM}/1000$) ($\approx 3,500$ rpm) por 15 min a temperatura ambiente (TA), se eliminó el sobrenadante. La pastilla de bacterias se resuspendió en PBS 1x (Cloruro de sodio 1.5mM, Fosfato de sodio monobásico 9.1 mM, Fosfato de sodio dibásico 1.25 mM) cbp 50 ml para lavar el botón y se centrifugó en las condiciones antes descritas por 10 min. Se hizo un segundo lavado y posteriormente se retiró el sobrenadante resuspendiendo la

pastilla en 15-20 ml de CRPMI 1640 (*Complete- Roswell Park Memorial Institute 1640*) (*L-Glutamina 2 mM, MEM aminoácidos no esenciales 0.1 mM, Piruvato de sodio 1 mM, Bicarbonato de sodio 20 mM*) con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) Para dispersar los agregados bacterianos, el cultivo se pasó dos veces por una jeringa con aguja de calibre 27G x 13 mm, se homogeneizó mediante agitación vigorosa (vórtex), se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Estos se mantuvieron a -20°C por 12 h y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su uso (17,48).

2.1.2 DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DEL INÓCULO.

Para determinar la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) contenidas en 1 ml de suspensión bacteriana congelada, se retiró un tubo del congelador y se incubó por 60 min a 37°C en baño María. Posteriormente, se dispersaron las bacterias pasándolas a través de una aguja calibre 27G, se realizaron una serie de diluciones décuples seriadas colocando 500 µl de la suspensión bacteriana en un tubo con 4500 µl de PBS 1x (10^{-1}), se agitó perfectamente, se tomaron de este tubo 50 µl, que se transfirieron a otro tubo con 450 µl de PBS 1x y así sucesivamente hasta realizar la dilución 10^{-7} . Una vez terminadas las diluciones, se procedió a sembrar 100 µl de cada uno de los tubos por triplicado a partir de la dilución 10^{-3} , en placas de agar Middlebrook 7H11 más 10% de OADC, homogeneizando perfectamente cada tubo antes de tomar las bacterias. Las cajas se incubaron por un periodo de 2 a 3 semanas y se contaron las colonias. De acuerdo a la cantidad de bacterias, se calculó el volumen necesario para obtener una concentración de bacterias/ml que dependió de la cantidad de células a infectar, es decir, para una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1, por cada 2×10^6 Mφ, se tomaron 2×10^7 bacterias que iban suspendidas en un volumen final de 300 µl de CRPMI + 15% SFB.

2.2 MACRÓFAGOS BOVINOS.

Los Mφ derivados de monocitos se aislaron a partir de sangre venosa periférica bovina de 6 animales clínicamente sanos, PPD (Derivado Proteico Purificado) negativos y en etapa productiva. De los seis animales se sabía que tres de ellos eran fenotípicamente resistentes, dos susceptibles y del sexto se desconocía su fenotipo (48).

Para el aislamiento de los monocitos se utilizó una modificación del protocolo de la técnica desarrollada por Campbell y Adams (11,21).

2.2.1 AISLAMIENTO DE MONOCITOS A PARTIR DE SANGRE VENOSA PERIFÉRICA.

Para colectar la sangre se colocaron en una jeringa, 4 ml de solución anticoagulante ácido cítrico-dextrosa (ACD) (*Citrato trisódico 75 mM, Acido cítrico 41.6 mM y Glucosa 135 mM; pH 5.0*) por cada 30 ml de sangre, mezclando la sangre y la solución ACD, invirtiendo la jeringa. También se colectó sangre en 10-12 tubos vacutainer con vacío, sin anticoagulante, para poder obtener el suero que se utilizó para preparar CRPMI con 10% de suero autólogo. La muestra así colectada se trasladó al laboratorio y se procedió a procesarla dentro de las 4 h después de su obtención.

En el laboratorio, la sangre se transfirió a tubos estériles con capacidad para 50 ml colocando un volumen máximo de 37.5 ml por tubo, se centrifugó a $\approx 2,800$ rpm por 30 min a 18°C. Se recuperó la fase superior, el plasma, para realizar lavados a las células blancas obtenidas. La fase intermedia o leucocitaria se transfirió a otro tubo. Por cada 15 ml de sangre colectada se mezcló con 15 ml de PBS-citrato (solución salina de fosfatos-Ácido cítrico trisódico 12.5 mM; pH 7.4). En otro tubo de 50 ml, se colocaron 15 ml de la suspensión de trabajo de Percoll (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) (**Ver Anexos**), a éste se le adicionaron 30 ml de la sangre-PBS-citrato (15ml Percoll: 15ml Sangre: 15ml PBS-Citrato) con sumo cuidado de forma tal que se evitara la mezcla de la sangre con el Percoll para mantener 2 fases: la suspensión de Percoll de trabajo en la parte inferior del tubo y sobre esta la sangre mezclada con el PBS-citrato. Los tubos así preparados se centrifugaron a $\approx 2,800$ rpm por 25 min a temperatura ambiente.

Al finalizar la centrifugación, se forman 3 fases, en la parte inferior del tubo: el agregado de eritrocitos y suspensión de Percoll de trabajo; la fase intermedia: leucocitos más plasma; y, la fase superior: plasma. La interfase, donde están suspendidas las células blancas, se transfirió a un tubo de 50 ml, agregándole PBS-citrato cbp 50 ml y se centrifugó a $\approx 1,600$ rpm por 10 min a 18°C.

El sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en 10 ml de plasma autólogo, adicionando PBS-citrato cbp 50 ml. Se centrifugó nuevamente bajo las condiciones antes descritas, repitiendo el último lavado dos veces más.

La pastilla formada en el último lavado, se resuspendió en 8 ml de CRPMI con 10% de suero autólogo (SA), esta suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer de Teflón, con capacidad de 50 ml, al cual se le agregaron previamente 12 ml de CRPMI sin suero, de esta manera el porcentaje de suero se redujo a 4%, lo que facilita la adherencia de los monocitos a la superficie del matraz. Los matraces se centrifugaron a $\approx 1,800$ rpm por 10 min a 18°C . El sobrenadante de cada matraz se recuperó en un tubo de 50 ml y se centrifugó en las mismas condiciones. Se resuspendió el botón obtenido en 8 ml del mismo medio y transfirió a un matraz nuevo. Al primer matraz se le agregaron 6.5 ml de CRPMI con 10% SA y se incubaron a 37°C con una atmósfera húmeda y con 5% CO_2 por 4-5 días.

Los matraces con la suspensión de células recuperadas a partir de los originales, se incubaron por 24 h a 37°C con humedad y 5% de CO_2 . Posteriormente se realizó un lavado suave de la superficie del matraz con una pipeta de transferencia y se retiró el medio de cultivo, esto para desechar las células no adheridas así como la fibrina que se llegó a formar. Se colocaron 6.5 ml de medio fresco y se incubaron a 37°C con humedad y 5% CO_2 .

Pasados 4-5 días el medio de todos los matraces, fue recuperado en un tubo de 50 ml que se centrifugó $\approx 1,800$ rpm por 10 min a 18°C , retirando el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en 6.5 ml de CRPMI + 10% SA, se transfirió a una caja de cultivo celular de 25 cm^2 . Esto se hizo para recuperar las células que se llegaron a despegar y que todavía permanecían viables. A los demás matraces se les agregó 6.5 ml de CRPMI con 10% SA y nuevamente se incubaron bajo las condiciones ya mencionadas.

2.2.2 COSECHA DE MACRÓFAGOS.

Una vez transcurrido un periodo de 13 días, en el cual han madurado los $\text{M}\phi$, se procedió a realizar la cosecha de las células para poder hacer el conteo de las mismas. Los matraces se colocaron en un recipiente con hielo hasta cubrir 2 terceras partes de los mismos, en esta condición se dejaron por un periodo de 35 min. Posteriormente los matraces se golpearon, las veces necesarias, para desprender las células.

El contenido de cada matraz se transfirió a un tubo de 50 ml y se llevó a cabo el conteo de las células mediante el uso de una cámara de Neubauer, en forma simultánea se centrifugó el tubo a 1,800 rpm por 10 min a 18°C .

Al terminar la centrifugación, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en una cantidad de medio (CRPMI con 10% SA) tal que la concentración de células por cada 5 ml fuera de $2.5-4 \times 10^6$ células. De esta suspensión se repartieron 5 ml por cada caja de cultivo celular de 25 cm².

Se incubaron los matraces por ≈ 18 h a 37°C con humedad y 5% de CO₂. Posteriormente se realizó la infección de las células.

2.2.3 INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS.

Las monocapas de M ϕ en las cajas de cultivo celular se infectaron con *M. bovis* usando una MOI de 10:1.

A todas las cajas se les retiró el sobrenadante y se les agregaron 6.7 ml de CRPMI +10% SA, añadiendo la concentración de bacterias necesarias, suspendidas en un volumen de 300 μ l de CRPMI + 15% SFB, para que el volumen final por caja de cultivo fuera de 7 ml, se centrifugaron a 1,800 rpm por 10 min e incubaron a 37°C por 4 h, tiempo necesario para la fagocitosis. Después de transcurrido este periodo, las células se lavaron 3 veces con ≈ 3.5 ml de PBS 1x para remover las bacterias extracelulares, incubando nuevamente a 37°C. A partir de este momento se consideró el tiempo cero postinfección.

Se utilizaron como controles M ϕ sin infectar así como M ϕ estimulados con partículas de látex para poder descartar la sobreexpresión del gen como consecuencia de la fagocitosis. Estos M ϕ fueron tratados de la misma manera que las células infectadas para poder mantener comparaciones válidas.

2.3 EXTRACCIÓN DE RNA.

Siguiendo los pasos que marca el protocolo incluido con el reactivo **TriPure® Isolation Reagent (BOEHRINGER MANNHEIM)** se procedió a realizar la extracción del RNA a partir de un monoestrato de células. Las extracciones de RNA se hicieron a las cero (0), ocho (8) y dieciséis (16) horas (h) postinfección (pi).

Para realizar las extracciones de RNA, se descartó el sobrenadante de cada caja y se llevó a cabo un lavado con ≈ 3.5 ml de PBS 1x, retirándolo y añadiendo directamente, 2 ml de **TriPure® (Ver Anexos)**.

2.3.1 CUANTIFICACIÓN.

Posterior a la extracción, el RNA que se obtuvo se cuantificó por espectrofotometría. Se realizó la dilución de la muestra (1/500) en agua libre de nucleasas. El factor corresponde a una densidad óptica a 260 nm equivalente a una

solución con una concentración de 40 µg/ml de RNA. El rango de lectura va de 260 nm a 320 nm. El resultado se expresa en concentración de RNA en µg/µl.

2.3.2 ELECTROFORESIS.

Para analizar las muestras extraídas se utilizó un gel desnaturalizante de agarosa al 1%, basado en el protocolo que indica el manual para laboratorios Molecular Cloning (44).

Una vez conocida la concentración de RNA y corroborada la integridad del mismo mediante electroforesis, se limpiaron las muestras de DNA genómico que pudiera estar contaminando.

2.3.3 PURIFICACIÓN DEL RNA.

Para eliminar el DNA contaminante, fue necesario dar un tratamiento con DNasa mediante el RNase-Free DNase Set (50) (QIAGEN) y posteriormente se siguieron los pasos que marca el protocolo del RNeasy® MinElute™ Cleanup kit (50) (QIAGEN), para eliminar los residuos de enzima (**Ver Anexos**). Posteriormente se cuantificó y analizó por electroforesis el RNA recuperado.

2.4 RT-PCR.

2.4.1 INICIADORES PARA PCR.

Se obtuvieron tres juegos de iniciadores, uno para el gen de interés (*Timosina* β10) y los otros dos para los controles internos (subunidad ribosomal 18s y G3PDH). Las secuencias de los mismos se determinaron tomando como referencia la secuencia correspondiente en el bovino al RNAm de cada gen, publicadas en GenBank: NCBI. Para *Timosina* β10: F 5'- AGC AAG CAA AGT GAG ATT TCC CGC -3' y R 5'- TAC ATC TTG CAG GTG GCT CTT CCT -3' (No. de acceso: NM_174623), para 18s: F 5'- GAA ACG GCT ACC ACA TCC AAG GAA - 3' y R 5'- AGG GCC TCG AAA GAG TCC TGT ATT -3' (No. de acceso: AY779625) y GA3PDH: F 5'- CAT GTT TGT GAT GGG CGT GAA CCA -3' y R 5'- TAA GTC CCT CCA CGA TGC CAA AGT -3' (No. de acceso: AJ000039).

2.4.2 SINTESIS DE cDNAs.

Basándose en los pasos que marca el protocolo incluido con el **Omniscript® RT Kit** (QIAGEN) para realizar la transcripción reversa de los cDNAs correspondientes, se preparó una mezcla "maestra" de acuerdo a la tabla mostrada en los Anexos, adicionando las muestras específicas, posteriormente se incubó en el termociclador (Hybaid PCR Express, ThermoHybaid) por 60 min a 37°C seguido de un ciclo a

93°C por 5 min para desnaturalizar la enzima. Para todas las muestras se utilizó un oligo(dT) como iniciador.

2.4.3 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR-RT).

Una vez obtenido el cDNA, éste se amplificó mediante un PCR, se utilizó SYBR Green para detectar la amplificación por fluorescencia. Las reacciones se prepararon como se indica en la tabla correspondiente en los Anexos. La reacción se llevó a cabo en el termociclador para tiempo real ABI Prism® 7000 (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 1er Estado: 95°C por 10 min, 1 ciclo; 2º Estado: 95°C por 15 seg, 60°C por 15 seg y 72°C por 40 seg, 35 ciclos; y, 3er Estado: 72°C por 5 min, 1 ciclo y 4°C como temperatura de almacenamiento (8,9,43).

2.4.4 ANALISIS DE RESULTADOS.

Los resultados se obtuvieron mediante el ABI Prism 7000 Sequence Detection System versión 1.1 Software (Applied Biosystems) incluido con el termociclador para Tiempo Real, amablemente prestados para su uso por la Escuela de Graduados de Sanidad perteneciente a la Escuela Médico Militar, instalaciones donde se localiza el equipo.

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el método comparativo de C_T (DDC_T) para la cuantificación relativa de la expresión de genes, utilizando el programa GraphPad Prism 4 (8,9,15,41).

Algunos de los productos de PCR se analizaron mediante un gel de agarosa al 1% usando un marcador de peso molecular de DNA (100pb) comercial, siguiendo el procedimiento del protocolo ya conocido, esto para corroborar que el producto de la amplificación tuviera el tamaño esperado.

Para el análisis estadístico se empleó una prueba t de student para comparación de medias (paired-samples t test), mediante el programa SPSS 10.0 para Windows, utilizando una significancia de 0.05 para determinar si existía diferencia estadística significativa en los resultados obtenidos.

3.0 RESULTADOS.

3.1 ENSAYO DE PROTECCION DE RIBONUCLEASAS (RPA).

Inicialmente se pretendía llevar a cabo el análisis de la expresión de *Timosina* β -10 mediante la técnica de Ensayo de Protección de Ribonucleasas (RPA). Se elaboró una sonda correspondiente a una secuencia complementaria al RNAm del gen de interés, utilizándose como marcaje para la sonda, un complejo de Psoralen-Biotina para lograr la detección mediante quimioluminiscencia. Una vez lista la sonda, se realizaron una serie de experimentos piloto con la intención de estandarizar la técnica. Se tuvieron una serie de dificultades para obtener resultados favorables en la estandarización de la técnica. La elaboración de la misma requiere de un tiempo considerable, dos a tres días, el número de reacciones por ensayo es limitado lo que también implica tiempo y, además, la cantidad mínima de RNA total que se requiere es de 5 μ g lo cual fue otra limitante debido a las bajas concentraciones de RNA obtenidas. Por todos los factores antes mencionados, se decidió implementar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real para el análisis de las muestras en lugar del RPA.

3.2 EXPRESION DEL GEN *Timosina* β -10 EN MACROFAGOS BOVINOS: RT-PCR EN TIEMPO REAL.

Los M ϕ recibieron los tratamientos correspondientes: no infectados (calibrador para interpretación de resultados), estimulados con partículas de látex para descartar la fagocitosis como causa de una sobreexpresión, infectados con cepa patógena (*M. bovis* 9926) y con cepa no patógena (*M. bovis* BCG) y posteriormente extraerles el RNA total, de los cuales se verificó su integridad mediante un gel de agarosa al 1%, tal como lo muestra la Figura 1.

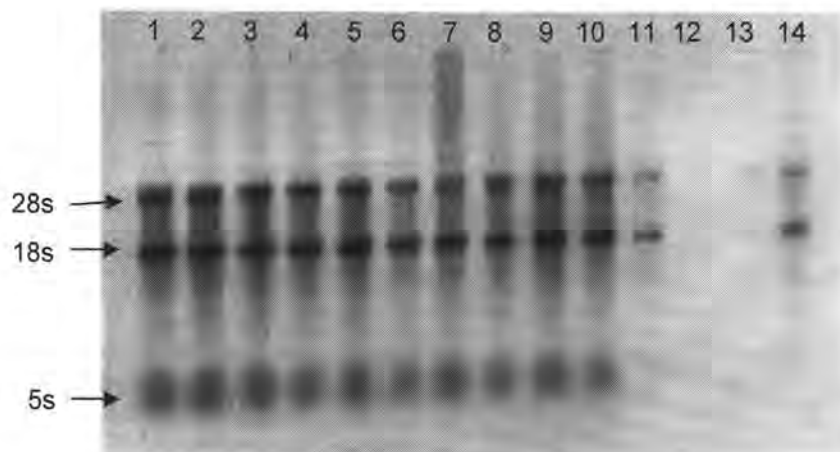


Fig 1. RNA total.
Se utilizó un gel de agarosa al 1%. Cada pozo contiene una muestra diferente de RNA. En la fotografía se señalan las tres subunidades ribosomales: 28, 18 y 5s.

Se obtuvieron los cDNAs correspondientes a cada grupo para poder realizar los PCRs en tiempo real. Todos los resultados se analizaron mediante el método comparativo de C_T (DDC_T) para la cuantificación relativa de la expresión de genes, utilizando como normalizador el gen de la dehidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH). Antes de comenzar la evaluación de las muestras se llevaron a cabo, primero una curva de disociación (Ver Anexos) para corroborar que el producto de la amplificación fuese específico y por otro lado, una curva de diluciones para comprobar la eficiencia de la reacción, es decir, para verificar que la expresión del gen de interés con respecto al control de referencia (normalizador) fuesen similares entre ellos a diversas concentraciones del templado.

La Tabla 1 muestra los datos correspondientes a la expresión relativa de los tiempos de cada grupo de forma comparativa entre cada vaca. Los resultados indican la expresión del gen de interés en Unidades Relativas (UR) en las células tratadas, ya sea por infección o con partículas de látex, comparado con el valor correspondiente a las células no infectadas. Los valores que se encuentra por debajo de 1 significan que la expresión disminuyó con respecto a la de los no infectados, si están por arriba de 1 significa que aumentó y si el resultado es igual a 1 entonces no hubo modificación con respecto a los no infectados (11,27). En ninguno de los datos se observó alguna alteración en la expresión del gen debido a la fagocitosis, estimulada con partículas de látex. Para determinar si los resultados obtenidos muestran una diferencia estadística significativa, se llevó a cabo la prueba t de student realizando la comparación entre dos medias. Los resultados del análisis estadístico así como del método comparativo de C_T , se pueden verificar en los Anexos.

TABLA 1. Expresión Relativa de *Timosina* β -10 en macrófagos bovinos infectados con *M. bovis*.

GRUPO / TIEMPO pi	v. 47	v. 99	v. 117	v. 75	v.98	v.130
PL 0h	0.855	1.008	1.323	1.474	0.295	0.759
BCG 0h	2.330	1.933	2.220	1.194	0.371	1.130
9926 0h	2.264	1.093	0.953	0.989	0.442	0.843
PL 8h	1.065	0.950	0.724	1.449	0.387	0.798
BCG 8h	1.667	1.900	1.694	0.729	0.202	0.794
9926 8h	1.779	0.637	0.704	1.739	0.304	0.828
PL 16h	0.681	1.202	0.742	1.279	0.400	0.634
BCG 16h	1.671	0.996	1.363	0.659	0.099	0.690
9926 16h	0.642	0.660	0.903	0.823	0.203	0.639

PL, partículas de látex; BCG, cepa no patógena; 9926, cepa patógena.

La Figura 2 muestra los datos de la expresión relativa en forma de gráfica, correspondientes a la vaca (v) 130 donde se puede observar un incremento en la expresión de *Timosina* β -10, 13% más que la inducida por las células no infectadas, a las 0h pi con BCG, para disminuir a las 8h y 16h. Por otro lado, en los M ϕ infectados con la cepa virulenta (9926), se presentó una disminución de 15.7% a las 0h pi con respecto a los no infectados, para disminuir nuevamente a las 16h pi. Al comparar la expresión del gen *Timosina* β -10 en los M ϕ infectados con la cepa BCG y los infectados con *M. bovis* 9926, no se observó alguna diferencia estadística significativa en el transcurso del tiempo de estudio. Al comparar el efecto de la infección con la estimulación con partículas de látex (PL), únicamente BCG presentó diferencia estadística significativa a las 0h pi, aumentando los niveles de expresión del gen con relación a PL.

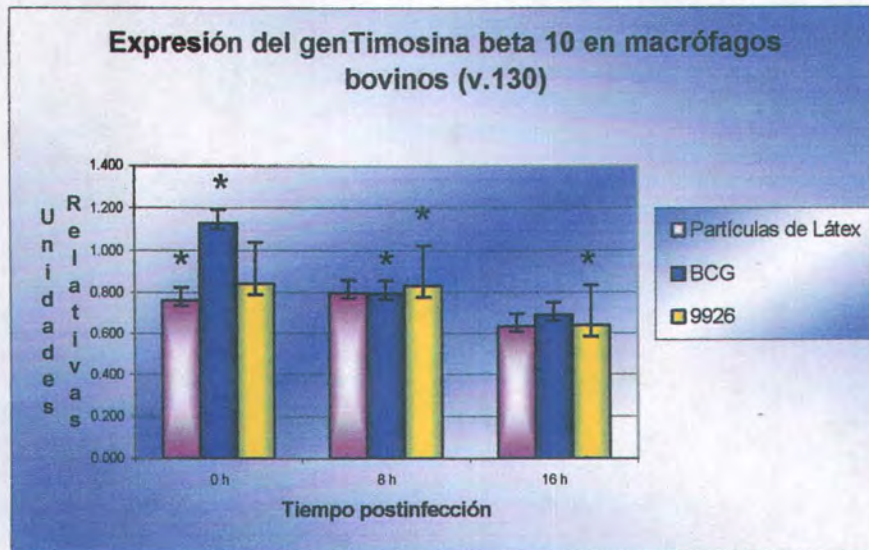


Fig 2. Expresión de *Timosina* β -10 en macrófagos de la vaca 130 determinada por RT-PCR. La expresión del gen de interés fue cuantificada a las 0, 8 y 16h pi, analizando el efecto entre la estimulación con Partículas de Látex (PL), infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa 9926. Se empleó el método comparativo de C_T así como la prueba t de student para comparación entre medias, con una significancia de 0.05. * indica el tiempo o grupo en el que hubo diferencia estadística significativa.

En la Figura 3 se muestra el resultado correspondiente a la vaca 99 donde la expresión del gen resulta ser un tanto diferente con respecto a lo observado en la vaca 130. En este caso se detectó un aumento de 99.3% en la expresión de *Timosina* β -10 en los $M\phi$ infectados con BCG para disminuir de forma significativa a las 16h pi, mientras que al infectar los $M\phi$ con 9926 el aumento de la expresión del gen a las 0h pi, fue de 9.3%, sin mostrar alguna diferencia estadística significativa con el transcurso del tiempo. Al comparar la expresión del gen en los $M\phi$ infectados con una cepa y con la otra, se observó que a lo largo de las 16h, BCG mantuvo niveles de expresión, estadísticamente significativos, por arriba de la inducida con la cepa patógena (9926), diferente a lo mostrado para la v130. Por otro lado, BCG fue la única cepa en mostrar diferencia significativa a las 0 y 8 h pi al incrementar la expresión del gen con respecto a la promovida por PL, mientras que a las 16h mantuvieron niveles semejantes.

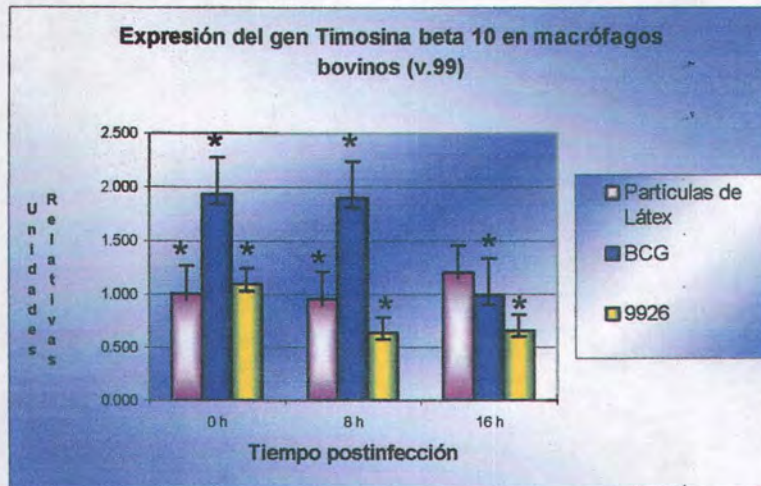


Fig 3. Expresión de *Timosina* β-10 en macrófagos de la vaca 99 determinada por RT-PCR. La expresión del gen de interés fue cuantificada a las 0, 8 y 16h pi, analizando el efecto entre la estimulación con Partículas de Látex (PL), infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa 9926. Se empleó el método comparativo de C_T así como la prueba t de student para comparación entre medias, con una significancia de 0.05. * indica el tiempo o grupo en el que hubo diferencia estadística significativa.

Al analizar los resultados de la vaca 47, lo que se determinó fue un incremento de 133% en la expresión de *Timosina* β-10 inmediatamente después de la infección por BCG, para disminuir a las 8h y mantenerse en el mismo nivel a las 16h pi. Al infectar las células con la cepa 9926 se observó un incremento de 126.4% en la expresión del gen a las 0h pi con respecto a las células no infectadas para disminuir de forma significativa, de acuerdo al análisis estadístico correspondiente, a las 16h pi. Al comparar los resultados de los Mφ infectados con BCG y con 9926, no se identificó alguna diferencia en la expresión del gen a las 0 y 8h pi debida al tipo de cepa utilizada, sin embargo, a las 16h BCG mostró una expresión mayor a la detectada por la cepa 9926. Con respecto a la estimulación con PL, a lo largo de las 16h de infección, BCG presentó niveles de expresión, estadísticamente significativos, mayores a lo inducido por PL, mientras que 9926 solo mostró diferencia significativa a las 0 y 8h pi, tal como lo muestra la Figura 4.

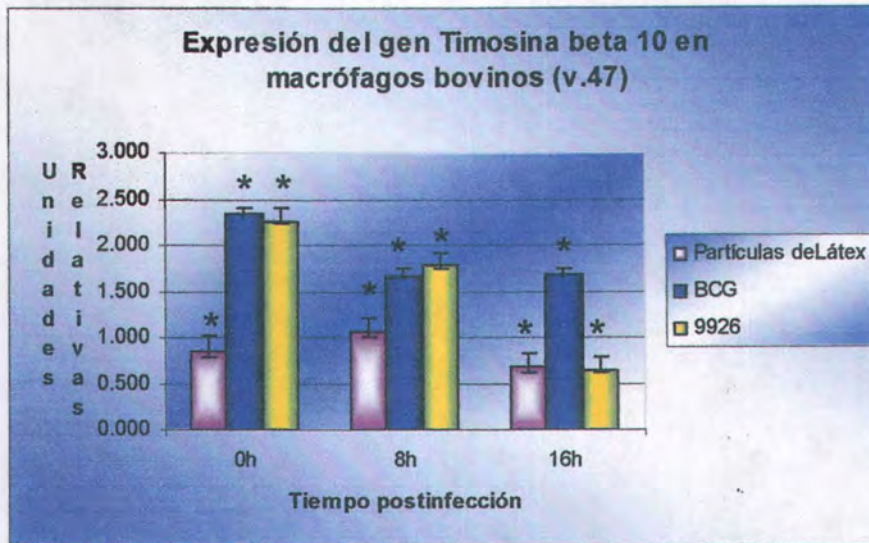


Fig 4. Expresión de Timosina β -10 en macrófagos de la vaca 47 determinada por RT-PCR. La expresión del gen de interés fue cuantificada a las 0, 8 y 16h pi, analizando el efecto entre la estimulación con Partículas de Látex (PL), infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa 9926. Se empleó el método comparativo de C_T así como la prueba t de student para comparación entre medias, con una significancia de 0.05. * indica el tiempo o grupo en el que hubo diferencia estadística significativa.

En el caso de la vaca 117, cuando se infectaron los $M\phi$ con BCG, se observó un aumento de 122% a las 0h pi en la expresión del gen de interés con respecto a los no infectados, para disminuir a las 8h y mantenerse en el mismo nivel a las 16h. A diferencia de las anteriores, en las células infectadas con la cepa 9926 a las 0h pi se detectó una disminución de 95.3% en relación a los no infectados manteniéndose sin alguna alteración estadísticamente significativa a las 8 y 16h posteriores. A las 0 y 8h pi, BCG mantuvo una sobreexpresión del gen por encima de la inducida por 9926, pero a las 16h, debido a la disminución en la expresión de Timosina β -10 inducida por BCG, los niveles de expresión no presentaron diferencia estadística significativa entre una cepa y otra. Al igual que la v99, BCG presentó diferencia únicamente a las 0 y 8h pi, al mostrar una expresión del gen por arriba de lo detectado para la estimulación con PL. Por otra parte, 9926 no presentó diferencia estadística significativa con respecto a PL (Fig. 5).

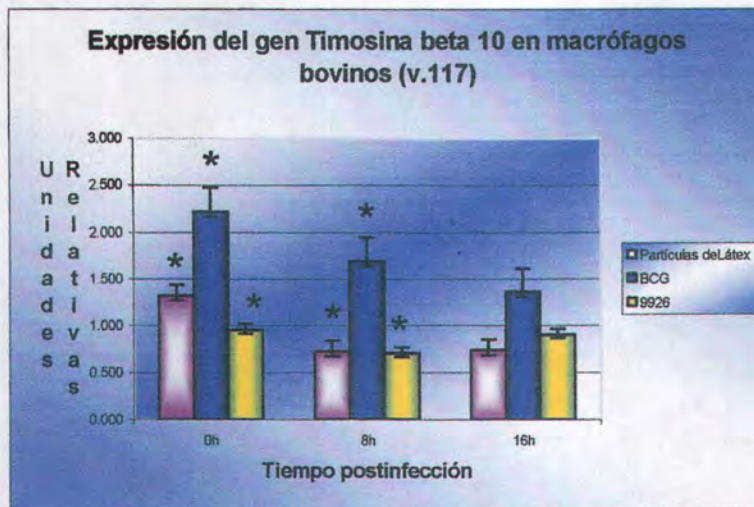


Fig 5. Expresión de Timosina β -10 en macrófagos de la vaca 117 determinada por RT-PCR. La expresión del gen de interés fue cuantificada a las 0, 8 y 16h pi, analizando el efecto entre la estimulación con Partículas de Látex (PL), infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa 9926. Se empleó el método comparativo de C_T así como la prueba t de student para comparación entre medias, con una significancia de 0.05. * indica el tiempo o grupo en el que hubo diferencia estadística significativa.

La Figura 6 muestra los resultados observados con respecto a la expresión de Timosina β -10 en los M ϕ obtenidos a partir de la vaca 75 donde, al infectar con BCG, se promueve un incremento en la expresión del gen de 119.4% a las 0h pi para disminuir a las 8h sin mostrar cambio alguno a las 16h. Cuando se infectó con 9926, al igual que en la v117, lo que se detectó fue una disminución de 1.1% a las 0h, pero a diferencia de lo observado en los resultados de todas las vacas, a las 8h aumentó la expresión a 1.739 UR, es decir 73.9% más, para disminuir a las 16 h pi de manera significativa. Comparando la influencia de una cepa con respecto a otra en lo que a la expresión del gen se refiere, a las 0 y 16h pi no se detectó alguna diferencia debida a la cepa utilizada mientras que a las 8h, la cepa 9926 fue la que indujo una sobreexpresión por encima de la promovida por BCG, esto claramente marcado por el incremento observado a este tiempo por la primera. En el transcurso de las 16h de infección, BCG mostró diferencia en los niveles de expresión del gen al mantenerlos por debajo de lo observado para PL, mientras que con 9926, la diferencia estadística se muestra a las 0 y 16h pi. A pesar del incremento significativo a las 8h pi con 9926, el nivel de expresión no presenta una diferencia significativa con relación a lo detectado en los M ϕ estimulados con PL.

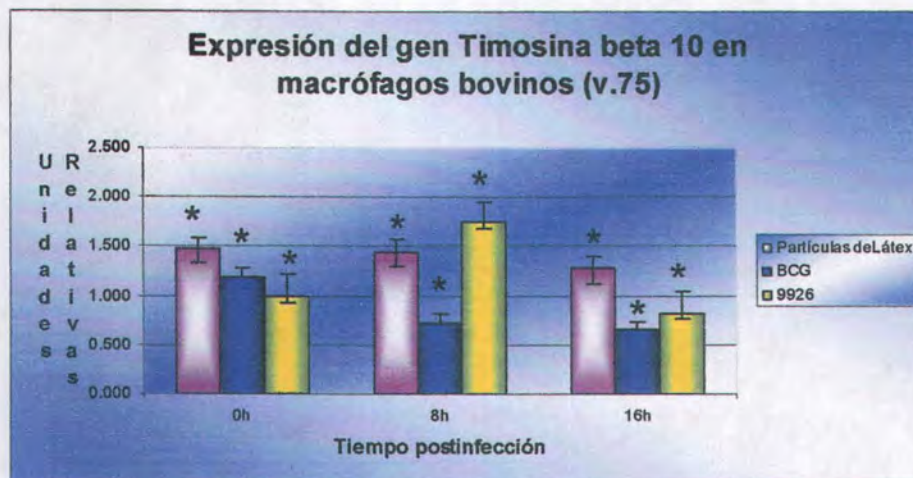


Fig 6. Expresión de Timosina β -10 en macrófagos de la vaca 75 determinada por RT-PCR. La expresión del gen de interés fue cuantificada a las 0, 8 y 16h pi, analizando el efecto entre la estimulación con Partículas de Látex (PL), infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa 9926. Se empleó el método comparativo de C_T así como la prueba t de student para comparación entre medias, con una significancia de 0.05. * indica el tiempo o grupo en el que hubo diferencia estadística significativa.

Los resultados obtenidos en el análisis de los $M\phi$ correspondientes a la vaca 98, muestran una tendencia diferente a lo ya estipulado para las otras vacas; esto es, al infectar con BCG, la expresión del gen fue de 0.371 UR disminuyendo la misma 62.9% con relación a las células no infectadas, continuando este descenso a las 8 y 16h posteriores. En las células infectadas con 9926, a las 0h pi la expresión del gen fue de 0.442 UR quedando, al igual que lo mostrado para BCG, 55.8% por debajo de las no infectadas, para tener otra reducción a las 8h y finalmente mantenerse en el mismo nivel pasadas las siguientes 8h. A las 0 y 8h ambas cepas inducen una expresión del gen de interés muy semejante mientras que a las 16h pi, 9926 mostró un nivel ligeramente mayor que BCG debido a que esta última promovió una disminución en la expresión para este tiempo. A las 0h pi se observó una diferencia estadística significativa en la expresión de Timosina β -10 entre la infección con BCG y 9926 con lo observado para PL, ya que las dos primeras estimularon un incremento en la expresión a este tiempo. Sin embargo, a las 8 y 16h pi en la infección por BCG, así como a las 16h pi al infectar con 9926, se determinó que existe diferencia estadística con respecto a la expresión debida a las PL, donde los niveles se encuentran por arriba de lo detectado para BCG y 9926 (Fig. 7):

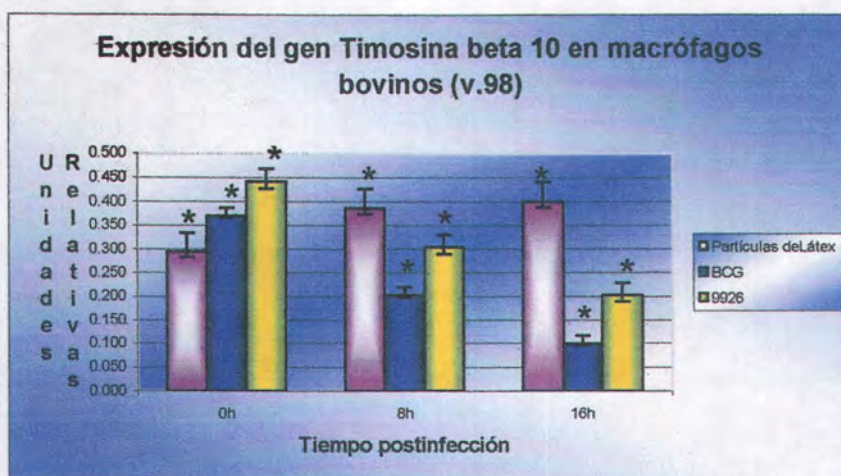


Fig 7. Expresión de *Timosina* β -10 en macrófagos de la vaca 98 determinada por RT-PCR. La expresión del gen de interés fue cuantificada a las 0, 8 y 16h pi, analizando el efecto entre la estimulación con Partículas de Látex (PL), infección con *M. bovis* BCG y *M. bovis* cepa 9926. Se empleó el método comparativo de C_T así como la prueba t de student para comparación entre medias, con una significancia de 0.05. * indica el tiempo o grupo en el que hubo diferencia estadística significativa.

En general, no se detectó alguna alteración a través del tiempo en la expresión de *Timosina* β -10 debida al proceso de fagocitosis, determinado esto por lo observado en los M ϕ estimulados con PL.

TABLA 2. Réplica Biológica de la Expresión Relativa de *Timosina* β -10 en macrófagos bovinos infectados con *M. bovis*

GRUPO / TIEMPO pi	v. 47	v. 99	v. 117	v. 75	v.98	v.130
PL 0h	0.878	1.064	1.329	1.136	0.283	1.712
BCG 0h	2.652	1.935	2.566	0.981	0.376	2.672
9926 0h	2.607	1.109	0.969	0.717	0.460	1.759
PL 8h	1.107	1.009	1.136	1.114	0.366	1.606
BCG 8h	1.812	1.869	1.735	0.547	0.189	1.694
9926 8h	2.010	0.635	0.719	1.287	0.292	1.637
PL 16h	0.636	1.302	0.763	1.012	0.348	1.418
BCG 16h	1.938	1.071	1.360	0.505	0.122	1.529
9926 16h	0.706	0.666	0.916	0.624	0.180	1.350

PL, partículas de látex; BCG, cepa no patógena; 9926, cepa patógena.

En todos los animales evaluados se llevó a cabo una réplica biológica, aislando monocitos, por segunda ocasión, a partir de sangre venosa periférica proveniente de los mismos bovinos, repitiendo todo el proceso hasta obtener las unidades relativas del gen mediante PCR en tiempo real. Los resultados mantuvieron la misma tendencia en la expresión de *Timosina* β -10 lo que nos permitió corroborar lo detectado en la primera evaluación (Tabla 2). Los resultados del método comparativo de C_T correspondientes a las réplicas biológicas pueden revisarse en los anexos.

4.0 DISCUSION.

Timosina β -10 es una proteína asociada al secuestro de actina involucrada en el rearrreglo del citoesqueleto celular tanto en células cancerosas así como en células que mueren por apoptosis (25,26,29,46,49,52). Gutiérrez-Pabello y col, en el 2002, reportaron que la sobreexpresión del gen *Timosina* β -10 y la muerte por apoptosis en M ϕ provenientes de bovino, estaban asociados a la infección con cepas de *M. bovis*. Los resultados de ese trabajo solo incluyeron datos procedentes de un donador bovino (21). Con base en lo anterior, se decidió evaluar una cantidad mayor de animales para corroborar los resultados obtenidos previamente. Mediante la técnica de PCR en tiempo real, analizamos el efecto de la infección por *M. bovis* en M ϕ derivados de monocitos de sangre venosa periférica, aislados a partir de seis bovinos clínicamente sanos; así como el efecto de la virulencia ya que se usaron dos cepas diferentes: una atenuada (*M. bovis* BCG) y otra patógena (*M. bovis* 9926).

Los resultados del presente estudio nos permiten concluir que la expresión del gen de *Timosina* β -10 presenta una variación dependiente del tiempo postinfección y del individuo ya que se observaron diferencias en los niveles de expresión del gen de un tiempo a otro dentro de un grupo de M ϕ que recibieron el mismo tratamiento y al comparar un individuo con otro, los resultados también presentaron variaciones.

En el caso de la virulencia, se observó una marcada diferencia en el efecto de la cepa sobre la expresión del gen de interés, ya que la infección con *M. bovis* BCG, en la mayoría de los casos produjo un incremento en los niveles de expresión de *Timosina* β -10 a las 0h pi, disminuyendo a las 8h para posteriormente mantenerse ó descender hasta las 16h pi. Mientras que para *M. bovis* 9926, en cuatro (vacas 117, 98, 130 y 75) de los 6 animales evaluados, el resultado fue una disminución en la expresión del gen respecto al nivel basal detectado en las células no infectadas. Por otra parte, la vaca (v) 47 presentó niveles de expresión sin diferencia estadística significativa entre las dos cepas a las 0 y 8h pi, siendo hasta las 16h pi cuando se logró detectar una diferencia aunque esto fue debido a una disminución en la expresión debida a la infección por 9926. Gutiérrez-Pabelló y col (21) encontraron que la infección por *M. bovis* virulento y avirulento (BCG) indujo un incremento de la expresión del gen del doble con respecto a lo mostrado para las células no infectadas a las 0 y a las 24h pi, mientras que al infectar con una cepa inactivada por calor, la sobreexpresión obtenida era menor. Los resultados que se obtuvieron en el

presente trabajo solo concuerdan parcialmente con lo reportado por Gutiérrez-Pabello (21) ya que el efecto de la cepa virulenta muestra un patrón de expresión diferente, mientras que en el caso de la expresión obtenida con BCG es bastante similar. Es importante señalar que las cepas utilizadas en ambos estudios son diferentes lo cual sugiere que el grado de virulencia de la cepa puede ser responsable de la diferencia en los resultados. Todos los resultados en conjunto apoyan la teoría de que la virulencia de la cepa juega un papel importante en la expresión de *Timosina* β -10.

Al analizar la modulación de la expresión del gen en el tiempo, lo que se observó fue un incremento a las 0h pi para disminuir posteriormente, en la mayoría de los M ϕ infectados con BCG, en algunos casos a las 8h y en otros hasta las 16h pi. Mientras que al momento de infectar con la cepa 9926, los niveles, aunque disminuían en algunos casos, en general se mantuvieron por debajo de la expresión obtenida en las células no infectadas, salvo por la v47, donde los M ϕ mostraron un patrón muy parecido a lo ya mencionado para el efecto por la infección con BCG. En ningún caso se llegó a detectar algún incremento en la expresión de *Timosina* β -10 posterior a las 0h pi, lo cual concuerda con lo observado por Gutiérrez –Pabello y col (21) donde, la expresión de *Timosina* β -10 tuvo un incremento con respecto al control negativo inmediatamente después de la infección, seguido de una disminución para aumentar ligeramente a las 24h pi. Estos resultados sugieren que el solo contacto con la bacteria y el proceso fagocítico de la misma es suficiente para estimular la expresión de *Timosina* β -10, mientras que el crecimiento intracelular de *Mycobacterium* parece no tener efecto en la expresión del gen.

A pesar de que se observó un incremento al inicio de la infección para posteriormente disminuir en los M ϕ procedentes de las vacas 130, 47, 117, 75 y 99, infectados con la cepa *M bovis* BCG, así como los M ϕ derivados de la v47, infectados con la cepa patógena *M. bovis* 9926, los niveles de expresión de un animal con respecto a otro no fueron semejantes.

Esquivel y col en el 2003 (17), demostraron que la infección por *M. bovis* promueve una inducción de apoptosis que es tiempo- así como individuo-dependiente ya que el estudio lo realizaron en M ϕ bovinos provenientes de individuos con fenotipo de resistencia y susceptibilidad a patógenos intracelulares (48), observando apoptosis en las células derivadas de ambos fenotipos siendo mayor los niveles de la misma en las células provenientes del individuo resistente, lo que les llevó a pensar que posiblemente los M ϕ de bovino con este fenotipo, controlan la infección bacteriana induciendo su propia muerte.

De los animales evaluados en el presente estudio, se sabe que las vacas 98, 75 y 130 son fenotípicamente resistentes, las vacas 117 y 47 son susceptibles, mientras que se desconoce el fenotipo de la vaca 99 (48). Por lo antes mencionado, se podría hipotetizar que si se evaluara el proceso de apoptosis en las células provenientes de estos mismos animales, se obtendrían mayores niveles de apoptosis en los resistentes que en los susceptibles. Estos datos en conjunto, así como los estudios sobre apoptosis donde se ha sugerido la participación de la proteína timosina β -10, indican que deberíamos de esperar mayor grado de apoptosis en los M ϕ de los individuos con mayor expresión de *Timosina* β -10. De acuerdo a los resultados del presente estudio los animales susceptibles mostraron el mayor grado de expresión de este gen, lo cual no concuerda con el postulado que establece que los M ϕ de los animales resistentes sufren el proceso de apoptosis en mayor grado, y por lo tanto debilita la asociación de la muerte por apoptosis y la sobreexpresión de *Timosina* β -10.

Por otro lado, en el mismo estudio realizado por Esquivel y col (17), los niveles de apoptosis aumentaron a través del tiempo, mientras que en nuestro trabajo ninguno de los resultados demostró seguir la misma tendencia para la expresión de *Timosina* β -10. Por lo anterior, no se puede asegurar que dicha proteína esté participando de manera fundamental en los rearrreglos del citoesqueleto durante el proceso de apoptosis en el modelo de M ϕ bovinos infectados con *M. bovis*, y que tal vez sean otras proteínas como la profilina, el factor de despolimerización de actina (ADF)/Cofilin o la actobindina (38,42,46) las que jueguen un papel importante en dicho evento, sin dejar de lado la función que ejerce la timosina β -10 dentro de la célula.

Los resultados obtenidos demuestran que la modulación de la expresión de *Timosina* β -10 se debe a la infección por *M. bovis* y dicha expresión es independiente de la fagocitosis, ya que no se observó el mismo resultado con M ϕ que fagocitaron perlas de látex y esta expresión es dependiente de cada individuo y del tiempo postinfección, así como de la virulencia de la cepa. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo, no sugieren que dicha proteína participe de manera fundamental en el proceso de apoptosis en M ϕ de bovino infectados con *M. bovis*. Se sugiere para investigaciones futuras, el cuantificar también la proteína, para conocer si la expresión del gen finalmente resulta en una traducción de la misma y posteriormente, podría llevarse a cabo algún estudio donde pudiera bloquearse la transcripción del RNAm de *Timosina* β -10 al tiempo que se midiera la inducción de apoptosis en las mismas células, analizando los mismos tiempos empleados en este trabajo, además de medir a las 24h pi los niveles de apoptosis

5.0 CONCLUSIONES

1. La expresión del gen *Timosina* β -10 es dependiente del individuo. Los donadores con fenotipo de susceptibilidad a patógenos intracelulares mostraron mayor grado de expresión del gen en comparación a los animales con fenotipo de resistencia.
2. Existe una diferencia en la expresión del gen que es dependiente del tiempo. En la mayoría de los casos se detectó una mayor expresión inmediatamente después de la infección, es decir a las 0h pi, para posteriormente disminuir.
3. La expresión de *Timosina* β -10 es dependiente de la virulencia de la cepa ya que en macrófagos infectados con la cepa BCG se observó una inducción en la expresión del gen mientras que con la cepa virulenta, prácticamente, no hubo cambios.

6.0 REFERENCIAS

1. Abiko T, Sekino H. Synthesis of deacetyl-thymosin β 10 and examination of its immunological effect on T-cell subpopulations of a uremic patient with tuberculosis. *Chem Pharm Bull.* 1986; 34: 4708-4717.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 3a ed New York & London: Garland Publishing Inc: 826-827.
3. Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GAW, Hernández PR. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculosis infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2002; 128: 229-237.
4. Astarie-Dequeker C, N'Diaye E, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Marindonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and non pathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun.* 1999; 67: 469-477.
5. Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage en: Lewis CE, Mc Gee JO'D. *The Natural Immune System: The Macrophage.* IRL PRESS New York: Oxford University Press, 1992: 3-6, 16-19.
6. Britton WJ, Roche PW, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol.* 1994; 2: 284-288.
7. Brosch R, Gordon SV, Marmiese M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 3684-3689.
8. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25: 169-193.

9. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29: 23-29.
10. Califano D, Monaco C, Santelli G, Giuliano A, Veronese ML, Berlingieri MT, De Franciscis V, Berger N, Trapasso F, Santoro M, Viglietto G, Fusco A. Thymosin beta-10 gene overexpression correlated with the highly malignant neoplastic phenotype of transformed thyroid cells in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 1998; 58: 823-828.
11. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 34: 291-305.
12. Carlier MF. Actin: Protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem.* 1991; 266: 1-4.
13. Carpintero P, Del Amo FF, Anadon R, Gómez Márquez J. Thymosin beta-10 mRNA expression during early postimplantation mouse development. *FEBS Lett.* 1996; 394: 103-106.
14. Dankner WM, Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics.* 2000; 105: 1-5.
15. Dorak MT. Real-Time PCR. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
16. Dramsi S, Cossart P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998; 14: 137-166.
17. Esquivel SH. Apoptosis por *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino: Efecto de la virulencia bacteriana y de la resistencia natural del hospedero. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

18. Fechheimer M, Zigmond SH. Focusing on unpolymerized actin. *J Cell Biol.* 1993; 123: 1-5.
19. FX Y, Lin SC, Morrison-Bogorad M., Yin HL. Effects of thymosin β -4 and thymosin β -10 on actin structures in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1994; 27: 13-25.
20. Grillon C, Rieger K, Bakala J, Schott D, Morgat JL, Hannappel E, Voelter W, Lenfant M. Involvement of thymosin β 4 and endoproteinase Asp-N in the biosynthesis of the tetrapeptide AcSerAspLysPro a regulator of the hematopoietic system. *FEBS Lett.* 1990; 274: 30-34.
21. Gutiérrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG. Upregulation of thymosin β -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect Immun.* 2002; 70: 2121-2127.
22. Hall AK, Chen SC, Hempstead JL, Morgan JI. Retinoic acid regulates Thymosin β 10 levels in rat neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 1991; 56: 462-468.
23. Hall AK. Retinoids and a retinoic acid receptor differentially modulate Thymosin β 10 gene expression in transfected neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol.* 1992; 12: 45-58.
24. Hall AK. Thymosin β -10 a cytoplasmic retinoic acid-responsive G-actin binding protein required for cell growth. Winter symposium on advances in gene technology: protein engineering and beyond. *Protein Engineering* 6 (Suppl.). 1993; 78.
25. Hall AK. Amplification-independent overexpression of thymosin beta 10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Ren Fail.* 1994; 16: 243-254.
26. Hall AK. Thymosin β -10 accelerates apoptosis. *Cell Mol Biol Res.* 1995; 41: 167-180.

27. Hall AK. Liarozole amplifies retinoid-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Anticancer Drugs*. 1996; 7: 312-320.
28. Huff T, Mueller CSG, Hannappel E. C-terminal truncation of thymosin beta-10 by an intracellular protease and its influence on the interaction with G-actin studied by ultrafiltration. *FEBS Lett*. 414: 39-44.
29. Janmey PA, Chaponnier C. Medical aspects of actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7: 111-117.
30. Kausalya S, Somogyi R, Orlofsky A, Prystowsky MB. Requirement of A1- α for Bacillus Calmette-Guérin-mediated protection of macrophages against nitric oxide-induced apoptosis. *J Immunol*. 2001; 166: 4721-4727.
31. Lee SH, Zhang W, Choi JJ, Cho YS, Lee SH, Kim JW, Hu L, Xu J, Liu J, Lee JH. Overexpression of the thymosin β -10 gene in human ovarian cancer cells disrupts F-actin stress fiber and leads to apoptosis. *Oncogene*. 2001; 20: 6700-6706.
32. Leondiadis L, Livaniou E, Vassiliadou I, Ferderigos N, Ithakissios DS, Evangelatos GP. Development of specific anti-Thymosin β 10 antipeptide antibodies for application in immunochemical techniques. *Peptides*. 1996; 17: 1091-1096.
33. Lugo DI, Chen SC, Hall AK, Ziai R, Hempstead JL, Morgan JI. Developmental regulation of β -Thymosins in the rat central nervous system. *J Neurochem*. 1991; 56: 457-461.
34. Martínez-Pomares L, Gordon S. Potential role of the mannose receptor in antigen transport. *Immun Letters*. 1999; 65: 9-13.
35. McPherson MJ, Møller SG. PCR. New York: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000: 10, 19-20, 205-208.
36. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995: Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). SAGARPA, 1997.

37. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol.* 1994; 40: 153-177
38. Nachmias VT. Small actin-binding proteins: the β -thymosin family. *Curr Opin Cell Biol.* 1993; 5: 56-62.
39. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). SAGARPA., 1995.
40. Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with percoll. *J Biochem Biophys Methods.* 2000; 44: 1-30.
41. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in Real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 2002-2007.
42. Pollard TD, Cooper J. Actin and actin binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann Rev Biochem.* 1986; 55: 987-1035.
43. Ramos-Payán R, Aguilar-Medina M, Estrada-Parra S, González-y-Merchand JA, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, Estrada-García ICE. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR® Green I. *Scand J Immunol.* 2003; 57: 439-445.
44. Sambrook, Russell. *Molecular Cloning*. Ed. CSHL 3ª edición, Vol. 1:7.33-7.34.
45. Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993; 150: 2920-2930.
46. Sun H-Q, Kwiatkowska K, Yin HL. β -Thymosins are not simple actin monomer buffering proteins. *J Biol Chem.* 1996; 271: 9223-9230.

47. Sun H-Q, Kwiatkowska K, Yin HL. Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7: 102-110.
48. Vallecillo MAJ. Crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* en macrófagos bovinos resistentes y susceptibles a parásitos intracelulares y su asociación al polimorfismo de la 3' UTR del Nramp1. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
49. Verghese-Nikolakaki S, Apostolikas N, Livaniou E, Ithakissios DS, Evangelatos GP. Preliminary findings on the expression of thymosin beta-10 in human breast cancer. *Br. J Cancer.* 1996; 74: 1441-1444.
50. Voisin PJ, Pardue S, Morrison-Bogorad M. Developmental characterization of thymosin beta 4 and beta 10 expression in enriched neuronal cultures from rat cerebella. *J Neurochem.* 1995; 64: 109-120.
51. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 2002; 4: 471-480.
52. Weterman MAJ, Van Muijen GNP, Ruitter DJ, Bloemers HPJ. Thymosin beta 10 expression in melanoma cell lines and melanocytic lesions a new progression marker for human cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 1993; 53: 278-284.
53. Yu FX, Lin SC, Bogorad MM, Yin HL. Effects of Thymosin β 4 and Thymosin β 10 on actin structures in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1994; 27: 13-25.
54. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 2003; 5: 159-167.

7.0 ANEXOS.

7.1 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE PERCOLL DE TRABAJO (40).

Para la recuperación de los monocitos por centrifugación isopícnica, se requiere que la suspensión a preparar de Percoll posea una gravedad específica similar a la de las células a separar. En este caso la gravedad específica (SG) de la suspensión de Percoll que se utiliza es de 1.0770. Para alcanzar esta gravedad específica se hace necesario adicionar al "Percoll stock" una serie de soluciones en volúmenes variables de acuerdo a la gravedad específica que posea cada una de ellas y la del "Percoll stock".

Percoll stock (Percoll):

- 10 volúmenes de Percoll comercial
- 1 volumen de NaCl 1.5 M, NaH₂PO₄ 100 mM

Se mide su índice de refracción (RI), el cual puede ser de: RI = 1.3530 a 1.3531

Para calcular la SG del Percoll, se utiliza esta fórmula: $SG\text{-Percoll} = (RI - 1.1814) / 0.1523$

Albúmina sérica bovina 5 % (BSA):

- 5 g de albúmina sérica bovina
- cbp 100 ml de H₂O destilada, se esteriliza por filtración en poro de 0.2 μm.

Se mide su índice de refracción (RI), el cual puede ser de: RI = 1.3415

Se calcula la SG de la BSA, con esta fórmula: $SG\text{-BSA} = (RI - 0.63727) / 0.69336$

Citrato de sodio 130 mM (Citrato):

- 19.11 g Citrato trisódico
- cbp 500 ml de H₂O destilada, se filtra para esterilizar.

Su índice de refracción (RI) se mide, el cual puede ser de: RI = 1.3388

Para calcular la SG del Citrato, se utiliza esta fórmula: $SG\text{-Citrato} = (RI - 1.0918) / 0.24129$

Solución balanceada de fosfatos (PBS):

- 87.7 g de NaCl
- 13.0 g de Na₂HPO₄
- 1.5 g de NaH₂PO₄
- cbp 1000 ml de H₂O destilada, se ajusta pH a 7.4 y se esteriliza por filtración.

Se mide su índice de refracción (RI), el cual puede ser de: RI = 1.3349

Se calcula la SG del PBS, con esta fórmula: $SG\text{-PBS} = (RI - 1.0918) / 0.24129$

Para calcular los volúmenes de cada una de las anteriores soluciones que se adicionan para preparar 30 ml de la suspensión de Percoll de trabajo, se hace necesario resolver la siguiente ecuación:

$$X(a) + 0.1(b) + 0.1(c) + (0.8-X)(d) = 1.077 - 1$$

donde:

$$* a = SG-PBS - 1$$

$$b = SG-BSA - 1$$

$$c = SG-Citrato - 1$$

$$d = SG-Percoll - 1$$

Se encuentra el valor de X.

Se resuelven cada una de las siguientes ecuaciones para determinar los volúmenes de:

$$- \text{Volumen PBS (ml)} = (X)(30 \text{ ml})$$

$$- \text{Volumen BSA (ml)} = 0.1(30 \text{ ml})$$

$$- \text{Volumen Citrato (ml)} = 0.1(30 \text{ ml})$$

$$- \text{Volumen Percoll (ml)} = (0.8 - X)(30 \text{ ml})$$

Todas las mediciones de Índice de refracción y el cálculo de los volúmenes de las soluciones a agregar para preparar la suspensión de Percoll de trabajo se realizan el mismo día que se utilizan.

Para agilizar el cálculo de los volúmenes de las soluciones incluidas en la suspensión de Percoll de trabajo, se desarrolló la siguiente hoja de cálculo, donde:

Preparación de suspensión de trabajo de Percoll.

Elementos:	RI:	SG:	Volumén
Albumina	1.34	1.013514	3
Citrato	1.3370	1.016205	3
PBS	1.333	0.999627	4.434305
Percoll	1.361	1.113592	19.565695
Vol. final	30		
SG	1.0770		
X =	0.14781015		

*Solo introducir valores de RI (Índice de refracción) en los cuadros indicados para Albumina, Citrato, PBS, Percoll y el volumen final requerido de la suspensión de trabajo de Percoll.

**No cambiar los datos en los otros cuadros.

Volumen a preparar, gravedad específica deseada, valor de X

Soluciones a utilizar, su gravedad específica y el volumen a adicionar

7.2 EXTRACCIÓN DE RNA: Tripure® Isolation Reagent de BOEHRINGER MANNHEIM, No de catálogo: 1667165.

5. Descartar el sobrenadante de cada caja y añadir, directamente, 1 ml de **TriPure®**, por cada 10 cm² de área cubierta por células (sin considerar el número de las mismas).
6. Homogeneizar el lisado celular con una pipeta estéril de transferencia.
7. Incubar el homogeneizado 5 min a temperatura ambiente (TA).
8. Transferir 1 ml del lisado celular a un tubo para Microcentrifuga, de polipropileno de 1.5 ml.
9. Agregar **200 µl** de **cloroformo** por cada ml de **TriPure®**.
10. Mezclar vigorosamente utilizando el vortex durante 15 seg.
11. Incubar a TA durante 15 min.
12. Centrifugar los tubos a 12 000 x g (11 000 rpm) durante 15 min a 4°C.
13. Transferir la fase acuosa (fracción incolora superior), alrededor de 600 µl, a un tubo eppendorf estéril nuevo de 1.5 ml.
14. Agregar **500 µl** de **isopropanol puro** por cada ml de **TriPure®**, requerido en la homogeneización inicial, a la fase acuosa. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
15. Incubar 10 min a TA para permitir la precipitación.
16. Centrifugar los tubos a 12000 x g durante 10 min a 4°C (observar la presencia de un botón blanco en el fondo del tubo al final de la centrifugación).
17. Decantar el sobrenadante con **cuidado de no perder el pellet** de RNA.
18. Agregar al menos 1 ml de **etanol al 75%** por cada ml de **TriPure®** y lavar el pellet mezclando por medio del vórtex.
19. Centrifugar la muestra a 7500 x g durante 5 min a 4° C y descartar el sobrenadante.
20. Remover el exceso de etanol y dejar secar al aire.
21. Resuspender el pellet de cada tubo en agua libre de nucleasas (tratada con **DEPC**), entre 20-40 µl, dependiendo del tamaño del pellet, y dejar incubar la muestra a 65°C durante 25 min.
22. Almacenar a **-80°C** hasta su uso.

7.3 PURIFICACIÓN DE RNA: RNase-Free DNase Set (50) de QIAGEN, No. de catálogo: 79254; y, **RNeasy® MinElute™ Cleanup kit (50)** de QIAGEN, No. de catálogo: 74204.

1. Para eliminar el DNA genómico (**RNase-Free DNase Set**) que pudiera contener la muestra, mezclar lo siguiente en un tubo para Microcentrifuga:
 - ≤ 87.5 µl Solución con RNA (contaminada con DNA genómico)
 - 10 µl Amortiguador RDD
 - 2.5 µl Solución con DNasa I

cbp 100 µl Agua libre de nucleasas
2. Incubar a TA por 10 min
3. Limpiar el RNA siguiendo el protocolo de **RNeasy MinElute cleanup**: adicionar 350 µl de amortiguador RLT al tubo con la muestra de RNA tratada con DNasa y mezclar bien, adicionar 250 µl de etanol 96-100% y mezclar bien. No centrifugar y continuar con paso 4.
4. Aplicar 700 µl de la muestra a la columna RNeasy MinElute Spin colocada en un tubo colector de 2 ml (suplementado con el kit), cerrar el tubo y centrifugar 15 seg a ≥8 000 xg (≥10 000 rpm). Descartar el líquido residual y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Agregar 500 µl de amortiguador RPE a la columna, cerrar el tubo y centrifugar 15 seg bajo las condiciones antes descritas para lavar la columna. Descartar el líquido residual y colocar la columna en el mismo tubo.

NOTA: El amortiguador RPE está concentrado, se debe adicionar etanol antes de usarse (11µl búfer + 44 ml etanol absoluto)
6. Adicionar 500 µl de etanol al 80% a la columna, cerrar el tubo y centrifugar x 2 min a la velocidad antes mencionada, para secar la membrana de silica-gel. Descartar el líquido residual y colocar la columna en el tubo colector.
7. Colocar el tubo en la microcentrifuga con la tapa de la columna abierta y centrifugar a máxima velocidad x 5 min. Descartar el líquido residual así como el tubo colector.
8. Para eluir, transferir la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml. Colocar 14 µl de agua libre de nucleasas directo al centro de la membrana, cerrar el tubo y centrifugar x 1 min a máx. velocidad.

7.4 TRANSCRIPCIÓN REVERSA: Omniscript® RT Kit de QUIAGEN, No. de catálogo: 205113.

Componente	Vol/reacción	Concentración Final
Mezcla "Maestra":		
- Amortiguador 10x RT	2.0 µl	1x
- Mezcla de dNTP (5mM de c/dNTP)	2.0 µl	0.5 mM de c/dNTP
- Iniciador Reverso: oligo dT (10 µM)*	2.0 µl	1 µM
- Transcriptasa Reversa Omniscript	1.0 µl	4 unidades (por 20µl reacción)
- Agua libre de RNasas	Variable	
Templado de RNA:		
- Templado de RNA	Variable	1-2 µg ‡ (por 20µl reacción)
Volumen Total	20.0 µl	

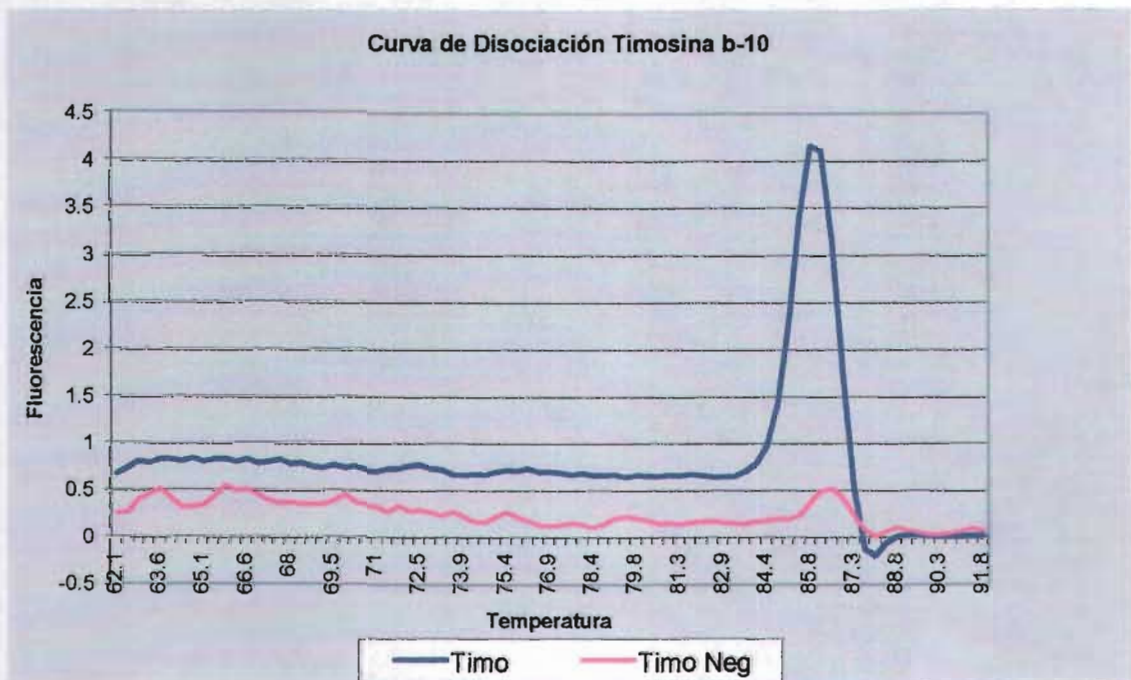
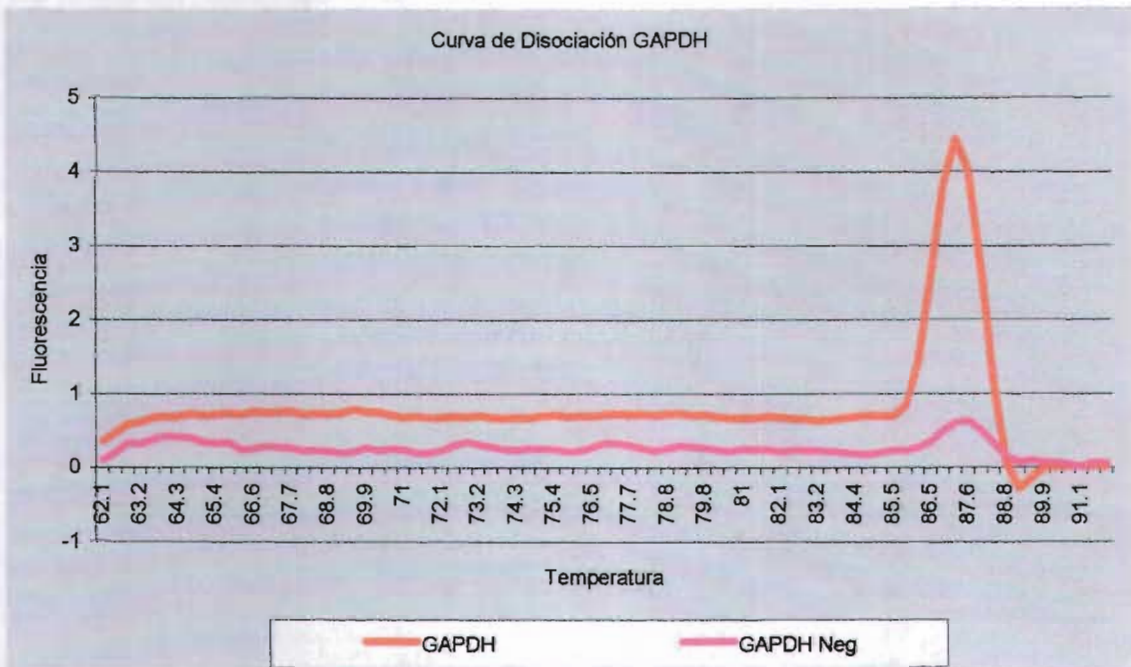
‡ Esta cantidad corresponde al RNA total presente, incluyendo cualquier RNAr, RNAm, RNA viral y RNA portador presente, sin tener en cuenta los primers usados o el cDNA analizado.

7.5 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

(PCR): Platinum® Taq DNA Polymerase de Invitrogen, No. de catálogo: 10966-030.

Componente	Vol/reacción	Concentración Final
Mezcla "Maestra":		
- Agua libre de nucleasas	12.9 µl	
- Amortiguador PCR 10x	2.5 µl	1x
- MgCl ₂ 50 mM	2 µl	4 mM
- dNTPs 10 mM	0.5 µl	200 µM de c/u
- SYBR Green 5x	0.825 µl	0.165 x
- Platinum Taq DNA Pol 5 U/µl	0.25 µl	1.25 Unidades
Iniciadores y Templado de cDNA:		
- Iniciador F (2.5 µM)	0.5 µl	50 nM
- Iniciador R (2.5 µM)	0.5 µl	50 nM
-cDNA	5 µl	12.5 ng
Volumen Total	25 µl	

7.6 CURVAS DE DISOCIACIÓN:



7.7 RESULTADOS MÉTODO COMPARATIVO DE C_T

7.7.1 VACA 47:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v47 Ni 0h	18.16	GAPDH v47 NI 0h	18.56	-0.4
TB10 v47 Ni 0h	17.78	GAPDH v47 NI 0h	18.23	-0.45
TB10 v47 Ni 0h	17.68	GAPDH v47 NI 0h	18.05	-0.37
TB10 v47 PL 0h	18.1	GAPDH v47 PL 0h	18.41	-0.31
TB10 v47 PL 0h	18.07	GAPDH v47 PL 0h	18.15	-0.08
TB10 v47 PL 0h	17.91	GAPDH v47 PL 0h	18.05	-0.14
TB10 v47 PL 8h	18.11	GAPDH v47 PL 8h	18.6	-0.49
TB10 v47 PL 8h	17.78	GAPDH v47 PL 8h	18.48	-0.7
TB10 v47 PL 8h	17.73	GAPDH v47 PL 8h	18	-0.27
TB10 v47 PL 16h	18.76	GAPDH v47 PL 16h	18.58	0.18
TB10 v47 PL 16h	18.46	GAPDH v47 PL 16h	18.55	-0.09
TB10 v47 PL 16h	18.4	GAPDH v47 PL 16h	18.01	0.39
TB10 v47 BCG 0h	16.57	GAPDH v47 BCG 0h	18.15	-1.58
TB10 v47 BCG 0h	16.43	GAPDH v47 BCG 0h	18.1	-1.67
TB10 v47 BCG 0h	16.39	GAPDH v47 BCG 0h	18.02	-1.63
TB10 v47 BCG 8h	17.02	GAPDH v47 BCG 8h	18.15	-1.13
TB10 v47 BCG 8h	16.91	GAPDH v47 BCG 8h	18.03	-1.12
TB10 v47 BCG 8h	16.82	GAPDH v47 BCG 8h	18	-1.18
TB10 v47 BCG 16h	17.09	GAPDH v47 BCG 16h	18.29	-1.2
TB10 v47 BCG 16h	17.02	GAPDH v47 BCG 16h	18.13	-1.11
TB10 v47 BCG 16h	16.92	GAPDH v47 BCG 16h	18.05	-1.13
TB10 v47 9926 0h	16.83	GAPDH v47 9926 0h	18.49	-1.66
TB10 v47 9926 0h	16.64	GAPDH v47 9926 0h	18.25	-1.61
TB10 v47 9926 0h	16.57	GAPDH v47 9926 0h	18.05	-1.48
TB10 v47 9926 8h	17.1	GAPDH v47 9926 8h	18.27	-1.17
TB10 v47 9926 8h	16.96	GAPDH v47 9926 8h	18.23	-1.27
TB10 v47 9926 8h	16.74	GAPDH v47 9926 8h	18.01	-1.27
TB10 v47 9926 16h	18.63	GAPDH v47 9926 16h	18.48	0.15
TB10 v47 9926 16h	18.4	GAPDH v47 9926 16h	18.13	0.27
TB10 v47 9926 16h	18.3	GAPDH v47 9926 16h	18.02	0.28

Prom DCT NI 0h

-0.407

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
0.097	-0.097	0.935	
0.327	-0.327	0.797	0.07181659
0.267	-0.267	0.831	
-0.083	0.083	1.059	
-0.293	0.293	1.225	0.15799391
0.137	-0.137	0.910	
0.587	-0.587	0.666	
0.317	-0.317	0.803	0.11442435
0.797	-0.797	0.576	
-1.173	1.173	2.255	
-1.263	1.263	2.400	0.07269843
-1.223	1.223	2.335	
-0.723	0.723	1.651	
-0.713	0.713	1.640	0.03734457
-0.773	0.773	1.709	
-0.793	0.793	1.733	
-0.703	0.703	1.628	0.05513549
-0.723	0.723	1.651	
-1.253	1.253	2.384	
-1.203	1.203	2.303	0.14384948
-1.073	1.073	2.104	
-0.763	0.763	1.697	
-0.863	0.863	1.819	0.07033792
-0.863	0.863	1.819	
0.557	-0.557	0.680	
0.677	-0.677	0.626	0.03264731
0.687	-0.687	0.621	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	0.855
BCG 0h	2.330
9926 0h	2.264
PL 8h	1.065
BCG 8h	1.667
9926 8h	1.779
PL 16h	0.681
BCG 16h	1.671
9926 16h	0.642

7.7.2 VACA 99:

Detector		Reporter		
CURVA STANDARD		SYBR		
ACTINA				
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v99 NI 0h	18.37	GAPDH v99 NI 0	18.22	0.15
TB10 v99 NI 0h	18.21	GAPDH v99 NI 0	18.1	0.11
TB10 v99 NI 0h	18.04	GAPDH v99 NI 0	18.04	0
TB10 v99 PL 0h	18.61	GAPDH v99 PL 0	18.59	0.02
TB10 v99 PL 0h	18.34	GAPDH v99 PL 0	18.17	0.17
TB10 v99 PL 0h	18.07	GAPDH v99 PL 0	18.03	0.04
TB10 v99 PL 8h	18.84	GAPDH v99 PL 8	18.82	0.02
TB10 v99 PL 8h	18.43	GAPDH v99 PL 8	18.35	0.08
TB10 v99 PL 8h	18.41	GAPDH v99 PL 8	18	0.41
TB10 v99 PL 16h	18.2	GAPDH v99 PL 16	18.1	0.1
TB10 v99 PL 16h	17.97	GAPDH v99 PL 16	18.05	-0.08
TB10 v99 PL 16h	17.53	GAPDH v99 PL 16	18.02	-0.49
TB10 v99 BCG 0h	17.48	GAPDH v99 BCG 0	18.61	-1.13
TB10 v99 BCG 0h	17.46	GAPDH v99 BCG 0	18.21	-0.75
TB10 v99 BCG 0h	17.36	GAPDH v99 BCG 0	18.03	-0.67
TB10 v99 BCG 8h	17.46	GAPDH v99 BCG 8	18.41	-0.95
TB10 v99 BCG 8h	17.38	GAPDH v99 BCG 8	18.2	-0.82
TB10 v99 BCG 8h	17.27	GAPDH v99 BCG 8	18.01	-0.74
TB10 v99 BCG 16h	18.44	GAPDH v99 BCG 16	18.48	-0.04
TB10 v99 BCG 16h	18.35	GAPDH v99 BCG 16	18.14	0.21
TB10 v99 BCG 16h	18.13	GAPDH v99 BCG 16	18.01	0.12
TB10 v99 9926 0h	18.61	GAPDH v99 9926 0	18.47	0.14
TB10 v99 9926 0h	18.1	GAPDH v99 9926 0	18.34	-0.24
TB10 v99 9926 0h	18.06	GAPDH v99 9926 0	18.06	0
TB10 v99 9926 8h	19.33	GAPDH v99 9926 8	18.64	0.69
TB10 v99 9926 8h	19.2	GAPDH v99 9926 8	18.24	0.96
TB10 v99 9926 8h	18.62	GAPDH v99 9926 8	18.03	0.59
TB10 v99 9926 16h	19.29	GAPDH v99 9926 16	18.75	0.54
TB10 v99 9926 16h	19.26	GAPDH v99 9926 16	18.48	0.78
TB10 v99 9926 16h	18.75	GAPDH v99 9926 16	18	0.75

Prom DCT NI 0h
0.087

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
-0.067	0.067	1.047	
0.083	-0.083	0.944	0.056
-0.047	0.047	1.033	
-0.067	0.067	1.047	
-0.007	0.007	1.005	0.133
0.323	-0.323	0.799	
0.013	-0.013	0.991	
-0.167	0.167	1.122	0.260
-0.577	0.577	1.491	
-1.217	1.217	2.324	
-0.837	0.837	1.786	0.342
-0.757	0.757	1.690	
-1.037	1.037	2.051	
-0.907	0.907	1.875	0.141
-0.827	0.827	1.774	
-0.127	0.127	1.092	
0.123	-0.123	0.918	0.088
0.033	-0.033	0.977	
0.053	-0.053	0.964	
-0.327	0.327	1.254	0.148
-0.087	0.087	1.062	
0.603	-0.603	0.658	
0.873	-0.873	0.546	0.082
0.503	-0.503	0.705	
0.453	-0.453	0.730	
0.693	-0.693	0.618	0.061
0.663	-0.663	0.631	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	1.008
BCG 0h	1.933
9926 0h	1.093
PL 8h	0.950
BCG 8h	1.900
9926 8h	0.637
PL 16h	1.202
BCG 16h	0.996
9926 16h	0.660

7.7.3 VACA 117:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v117 Ni 0h	16.98	v117 GAPDH Ni 0	18	-1.02
TB10 v117 Ni 0h	17.11	v117 GAPDH Ni 0	18.2	-1.09
TB10 v117 Ni 0h	17.39	v117 GAPDH Ni 0	18.41	-1.02
TB10 v117 PL 0h	17.1	v117 GAPDH PL 0	18.4	-1.3
TB10 v117 PL 0h	16.85	v117 GAPDH PL 0	18.39	-1.54
TB10 v117 PL 0h	17.21	v117 GAPDH PL 0	18.7	-1.49
TB10 v117 PL 8h	17.29	v117 GAPDH PL 8	18.01	-0.72
TB10 v117 PL 8h	17.59	v117 GAPDH PL 8	18.21	-0.62
TB10 v117 PL 8h	17.99	v117 GAPDH PL 8	18.36	-0.37
TB10 v 117 PL 16h	17.43	v117 GAPDH PL 16	18.02	-0.59
TB10 v 117 PL 16h	17.81	v117 GAPDH PL 16	18.33	-0.52
TB10 v 117 PL 16h	17.55	v117 GAPDH PL 16	18.27	-0.72
TB10 v117 BCG 0h	15.89	v117 GAPDH BCG 0	18.04	-2.15
TB10 v117 BCG 0h	15.96	v117 GAPDH BCG 0	18.19	-2.23
TB10 v117 BCG 0h	16	v117 GAPDH BCG 0	18.2	-2.2
TB10 v117 BCG 8h	16.19	v117 GAPDH BCG 8	18.03	-1.84
TB10 v117 BCG 8h	16.38	v117 GAPDH BCG 8	18.13	-1.75
TB10 v117 BCG 8h	16.26	v117 GAPDH BCG 8	18.08	-1.82
TB10 v117 BCG 16h	16.27	v117 GAPDH BCG 16	18.01	-1.74
TB10 v117 BCG 16h	17.01	v117 GAPDH BCG 16	18.21	-1.2
TB10 v117 BCG 16h	16.62	v117 GAPDH BCG 16	18.1	-1.48
TB10 v117 9926 0h	17.04	v117 GAPDH 9926 0	18.04	-1
TB10 v117 9926 0h	17.13	v117 GAPDH 9926 0	18.04	-0.91
TB10 v117 9926 0h	17.37	v117 GAPDH 9926 0	18.38	-1.01
TB10 v117 9926 8h	17.52	v117 GAPDH 9926 8	18.03	-0.51
TB10 v117 9926 8h	17.61	v117 GAPDH 9926 8	18.27	-0.66
TB10 v117 9926 8h	17.95	v117 GAPDH 9926 8	18.38	-0.43
TB10 v117 9926 16h	17.03	v117 GAPDH 9926 16	18.01	-0.98
TB10 v117 9926 16h	17.42	v117 GAPDH 9926 16	18.19	-0.77
TB10 v117 9926 16h	17.5	v117 GAPDH 9926 16	18.43	-0.93

Prom DCT NI 0h
-1.043

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
-0.257	0.257	1.195	
-0.497	0.497	1.411	0.114
-0.447	0.447	1.363	
0.323	-0.323	0.799	
0.423	-0.423	0.746	0.088
0.673	-0.673	0.627	
0.453	-0.453	0.730	
0.523	-0.523	0.696	0.053
0.323	-0.323	0.799	
-1.107	1.107	2.153	
-1.187	1.187	2.276	0.062
-1.157	1.157	2.229	
-0.797	0.797	1.737	
-0.707	0.707	1.632	0.055
-0.777	0.777	1.713	
-0.697	0.697	1.621	
-0.157	0.157	1.115	0.253
-0.437	0.437	1.353	
0.043	-0.043	0.970	
0.133	-0.133	0.912	0.036
0.033	-0.033	0.977	
0.533	-0.533	0.691	
0.383	-0.383	0.767	0.058
0.613	-0.613	0.654	
0.063	-0.063	0.957	
0.273	-0.273	0.827	0.067
0.113	-0.113	0.924	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	1.323
BCG 0h	2.220
9926 0h	0.953
PL 8h	0.724
BCG 8h	1.694
9926 8h	0.704
PL 16h	0.742
BCG 16h	1.363
9926 16h	0.903

7.7.4 VACA 98:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v98 Ni 0h	15.14	v98 GAPDH Ni 0	18.07	-2.93
TB10 v98 Ni 0h	15.42	v98 GAPDH Ni 0	18.26	-2.84
TB10 v98 Ni 0h	15.57	v98 GAPDH Ni 0	18.52	-2.95
TB10 v98 PL 0h	16.9	v98 GAPDH PL 0	18.02	-1.12
TB10 v98 PL 0h	17.02	v98 GAPDH PL 0	18.12	-1.1
TB10 v98 PL 0h	17.18	v98 GAPDH PL 0	18.39	-1.21
TB10 v98 PL 8h	16.63	v98 GAPDH PL 8	18.05	-1.42
TB10 v98 PL 8h	16.78	v98 GAPDH PL 8	18.42	-1.64
TB10 v98 PL 8h	16.88	v98 GAPDH PL 8	18.42	-1.54
TB10 v 98 PL 16h	16.58	v98 GAPDH PL 16	18.01	-1.43
TB10 v 98 PL 16h	16.66	v98 GAPDH PL 16	18.38	-1.72
TB10 v 98 PL 16h	16.91	v98 GAPDH PL 16	18.5	-1.59
TB10 v98 BCG 0h	16.59	v98 GAPDH BCG 0	18.04	-1.45
TB10 v98 BCG 0h	16.77	v98 GAPDH BCG 0	18.19	-1.42
TB10 v98 BCG 0h	16.77	v98 GAPDH BCG 0	18.32	-1.55
TB10 v98 BCG 8h	17.27	v98 GAPDH BCG 8	18	-0.73
TB10 v98 BCG 8h	17.46	v98 GAPDH BCG 8	18.02	-0.56
TB10 v98 BCG 8h	17.58	v98 GAPDH BCG 8	18.08	-0.5
TB10 v98 BCG 16h	18.4	v98 GAPDH BCG 16	18.03	0.37
TB10 v98 BCG 16h	18.54	v98 GAPDH BCG 16	18.06	0.48
TB10 v98 BCG 16h	18.57	v98 GAPDH BCG 16	18.13	0.44
TB10 v98 9926 0h	16.39	v98 GAPDH 9926 0	18.07	-1.68
TB10 v98 9926 0h	16.41	v98 GAPDH 9926 0	18.09	-1.68
TB10 v98 9926 0h	16.53	v98 GAPDH 9926 0	18.35	-1.82
TB10 v98 9926 8h	16.99	v98 GAPDH 9926 8	18.04	-1.05
TB10 v98 9926 8h	17.04	v98 GAPDH 9926 8	18.25	-1.21
TB10 v98 9926 8h	17.17	v98 GAPDH 9926 8	18.47	-1.3
TB10 v98 9926 16h	17.43	v98 GAPDH 9926 16	18.04	-0.61
TB10 v98 9926 16h	17.55	v98 GAPDH 9926 16	18.05	-0.5
TB10 v98 9926 16h	17.61	v98 GAPDH 9926 16	18.31	-0.7

Prom DCT NI 0h
-2.907

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
1.787	-1.787	0.290	
1.807	-1.807	0.286	0.012
1.697	-1.697	0.308	
1.487	-1.487	0.357	
1.267	-1.267	0.416	0.029
1.367	-1.367	0.388	
1.477	-1.477	0.359	
1.187	-1.187	0.439	0.040
1.317	-1.317	0.401	
1.457	-1.457	0.364	
1.487	-1.487	0.357	0.018
1.357	-1.357	0.390	
2.177	-2.177	0.221	
2.347	-2.347	0.197	0.017
2.407	-2.407	0.189	
3.277	-3.277	0.103	
3.387	-3.387	0.096	0.004
3.347	-3.347	0.098	
1.227	-1.227	0.427	
1.227	-1.227	0.427	0.025
1.087	-1.087	0.471	
1.857	-1.857	0.276	
1.697	-1.697	0.308	0.026
1.607	-1.607	0.328	
2.297	-2.297	0.204	
2.407	-2.407	0.189	0.014
2.207	-2.207	0.217	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	0.295
BCG 0h	0.371
9926 0h	0.442
PL 8h	0.387
BCG 8h	0.202
9926 8h	0.304
PL 16h	0.400
BCG 16h	0.099
9926 16h	0.203

7.7.5 VACA 75:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v75 Ni 0h	17.48	GAPDH v75 NI 0h	18.04	-0.56
TB10 v75 Ni 0h	17.6	GAPDH v75 NI 0h	18.26	-0.66
TB10 v75 Ni 0h	18.03	GAPDH v75 NI 0h	18.41	-0.38
TB10 v75 PL 0h	17.02	GAPDH v75 PL 0h	18.05	-1.03
TB10 v75 PL 0h	17.18	GAPDH v75 PL 0h	18.2	-1.02
TB10 v75 PL 0h	17.25	GAPDH v75 PL 0h	18.47	-1.22
TB10 v75 PL 8h	17.06	GAPDH v75 PL 8h	18.03	-0.97
TB10 v75 PL 8h	17.06	GAPDH v75 PL 8h	18.05	-0.99
TB10 v75 PL 8h	17.15	GAPDH v75 PL 8h	18.38	-1.23
TB10 v75 PL 16h	17.15	GAPDH v75 PL 16h	18.01	-0.86
TB10 v75 PL 16h	17.24	GAPDH v75 PL 16h	18.06	-0.82
TB10 v75 PL 16h	17.32	GAPDH v75 PL 16h	18.3	-0.98
TB10 v75 BCG 0h	17.26	GAPDH v75 BCG 0h	18.01	-0.75
TB10 v75 BCG 0h	17.42	GAPDH v75 BCG 0h	18.13	-0.71
TB10 v75 BCG 0h	17.56	GAPDH v75 BCG 0h	18.46	-0.9
TB10 v75 BCG 8h	17.93	GAPDH v75 BCG 8h	18.01	-0.08
TB10 v75 BCG 8h	17.94	GAPDH v75 BCG 8h	18.02	-0.08
TB10 v75 BCG 8h	18.11	GAPDH v75 BCG 8h	18.18	-0.07
TB10 v75 BCG 16h	18.08	GAPDH v75 BCG 16h	18.01	0.07
TB10 v75 BCG 16h	18.28	GAPDH v75 BCG 16h	18.3	-0.02
TB10 v75 BCG 16h	18.47	GAPDH v75 BCG 16h	18.31	0.16
TB10 v75 9926 0h	17.51	GAPDH v75 9926 0h	18.05	-0.54
TB10 v75 9926 0h	17.58	GAPDH v75 9926 0h	18.16	-0.58
TB10 v75 9926 0h	17.81	GAPDH v75 9926 0h	18.24	-0.43
TB10 v75 9926 8h	16.59	GAPDH v75 9926 8h	18.03	-1.44
TB10 v75 9926 8h	16.68	GAPDH v75 9926 8h	18.11	-1.43
TB10 v75 9926 8h	17.03	GAPDH v75 9926 8h	18.13	-1.1
TB10 v75 9926 16h	17.68	GAPDH v75 9926 16h	18.06	-0.38
TB10 v75 9926 16h	18.29	GAPDH v75 9926 16h	18.3	-0.01
TB10 v75 9926 16h	18.4	GAPDH v75 9926 16h	18.74	-0.34

Prom DCT NI 0h

-0.533

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
-0.497	0.497	1.411	
-0.487	0.487	1.401	0.118
-0.687	0.687	1.610	
-0.437	0.437	1.353	
-0.457	0.457	1.372	0.149
-0.697	0.697	1.621	
-0.327	0.327	1.254	
-0.287	0.287	1.220	0.075
-0.447	0.447	1.363	
-0.217	0.217	1.162	
-0.177	0.177	1.130	0.084
-0.367	0.367	1.289	
0.453	-0.453	0.730	
0.453	-0.453	0.730	0.003
0.463	-0.463	0.725	
0.603	-0.603	0.658	
0.513	-0.513	0.701	0.041
0.693	-0.693	0.618	
-0.007	0.007	1.005	
-0.047	0.047	1.033	0.053
0.103	-0.103	0.931	
-0.907	0.907	1.875	
-0.897	0.897	1.862	0.224
-0.567	0.567	1.481	
0.153	-0.153	0.899	
0.523	-0.523	0.696	0.111
0.193	-0.193	0.875	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	1.474
BCG 0h	1.194
9926 0h	0.989
PL 8h	1.449
BCG 8h	0.729
9926 8h	1.739
PL 16h	1.279
BCG 16h	0.659
9926 16h	0.823

7.7.6 VACA 130:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TIMO v130 NI 0h	17.0364	v130 GAPDH NI 0h	18.06	-1.0236
TIMO v130 NI 0h	16.7886	v130 GAPDH NI 0h	18.009	-1.2204
TIMO v130 NI 0h	16.7939	v130 GAPDH NI 0h	18.0627	-1.2688
TB10 v130 PL 0h	17.57	v130 GAPDH PL 0h	18.36	-0.79
TB10 v130 PL 0h	17.39	v130 GAPDH PL 0h	18.27	-0.88
TB10 v130 PL 0h	17.38	v130 GAPDH PL 0h	18.02	-0.64
TB10 v130 PL 8h	17.6	v130 GAPDH PL 8h	18.41	-0.81
TB10 v130 PL 8h	17.22	v130 GAPDH PL 8h	18.15	-0.93
TB10 v130 PL 8h	17.22	v130 GAPDH PL 8h	18.01	-0.79
TB10 v130 PL 16h	17.63	v130 GAPDH PL 16h	18.08	-0.45
TB10 v130 PL 16h	17.53	v130 GAPDH PL 16h	18.08	-0.55
TB10 v130 PL 16h	17.48	v130 GAPDH PL 16h	18.02	-0.54
TB10 v130 BCG 0h	17.05	v130 GAPDH BCG 0h	18.32	-1.27
TB10 v130 BCG 0h	16.89	v130 GAPDH BCG 0h	18.16	-1.27
TB10 v130 BCG 0h	16.57	v130 GAPDH BCG 0h	18.06	-1.49
TB10 v130 BCG 8h	17.66	v130 GAPDH BCG 8h	18.4	-0.74
TB10 v130 BCG 8h	17.37	v130 GAPDH BCG 8h	18.21	-0.84
TB10 v130 BCG 8h	17.08	v130 GAPDH BCG 8h	18.01	-0.93
TB10 v130 BCG 16h	17.8	v130 GAPDH BCG 16h	18.84	-1.04
TB10 v130 BCG 16h	17.72	v130 GAPDH BCG 16h	18.04	-0.32
TB10 v130 BCG 16h	17.59	v130 GAPDH BCG 16h	18.03	-0.44
TB10 v130 9926 0h	17.49	v130 GAPDH 9926 0h	18.45	-0.96
TB10 v130 9926 0h	17.41	v130 GAPDH 9926 0h	18.35	-0.94
TB10 v130 9926 0h	17.15	v130 GAPDH 9926 0h	18.02	-0.87
TB10 v130 9926 8h	17.46	v130 GAPDH 9926 8h	18.42	-0.96
TB10 v130 9926 8h	17.35	v130 GAPDH 9926 8h	18.31	-0.96
TB10 v130 9926 8h	17.25	v130 GAPDH 9926 8h	18.02	-0.77
TB10 v130 9926 16h	17.84	v130 GAPDH 9926 16h	18.31	-0.47
TB10 v130 9926 16h	17.6	v130 GAPDH 9926 16h	18.21	-0.61
TB10 v130 9926 16h	17.52	v130 GAPDH 9926 16h	18.01	-0.49

Prom DCT NI 0h
-1.171

DDCT	DDCT Neg	Expresión Relativa	DS
0.381	-0.381	0.768	
0.291	-0.291	0.817	0.063
0.531	-0.531	0.692	
0.361	-0.361	0.779	
0.241	-0.241	0.846	0.042
0.381	-0.381	0.768	
0.721	-0.721	0.607	
0.621	-0.621	0.650	0.024
0.631	-0.631	0.646	
-0.099	0.099	1.071	
-0.099	0.099	1.071	0.102
-0.319	0.319	1.248	
0.431	-0.431	0.742	
0.331	-0.331	0.795	0.052
0.241	-0.241	0.846	
0.131	-0.131	0.913	
0.851	-0.851	0.554	0.195
0.731	-0.731	0.603	
0.211	-0.211	0.864	
0.231	-0.231	0.852	0.027
0.301	-0.301	0.812	
0.211	-0.211	0.864	
0.211	-0.211	0.864	0.062
0.401	-0.401	0.757	
0.701	-0.701	0.615	
0.561	-0.561	0.678	0.034
0.681	-0.681	0.624	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	0.759
BCG 0h	1.130
9926 0h	0.843
PL 8h	0.798
BCG 8h	0.794
9926 8h	0.828
PL 16h	0.634
BCG 16h	0.690
9926 16h	0.639

7.8 RESULTADOS ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

7.8.1 T-Test Vaca 75

Notes

Output Created		11-MAY-2005 13:29:59
Comments		
Input	Data	C:\Mis documentos\SILVIA\SPSS\75 tipo y tiempo.sav
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	3
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST PAIRS= PL0h PL8h BCG0h BCG8h 9926 0h 9926 8h PL0h BCG0h PL0h PL8h BCG8h PL8h PL16h BCG16h PL16h WITH PL8h PL16h BCG8h BCG16h 9926 8h 9926 16h BCG0h 9926 0h 9926 0h BCG8h 9926 8h 9926 8h BCG16h 9926 16h 9926 16h (PAIRED) /CRITERIA=CIN(.95) /MISSING=ANALYSIS.	
Resources	Elapsed Time	0:00:00.00

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PL 0h	1.474	3	.11789	6.8061E-02
	PL 8h	1.449	3	.14955	8.6341E-02
Pair 2	PL 8h	1.449	3	.14955	8.6341E-02
	PL 16h	1.279	3	7.4706E-02	4.3132E-02
Pair 3	BCG 0h	1.194	3	8.4097E-02	4.8554E-02
	BCG 8h	.728	3	2.8868E-03	1.6667E-03
Pair 4	BCG 8h	.728	3	2.8868E-03	1.6667E-03
	BCG 16h	.659	3	4.1509E-02	2.3965E-02

Pair 5	9926 0h	.990	3	5.2700E-02	3.0427E-02
	9926 8h	1.739	3	.22382	.12922
Pair 6	9926 8h	1.739	3	.22382	.12922
	9926 16h	.823	3	.11092	6.4043E-02
Pair 7	PL 0h	1.474	3	.11789	6.8061E-02
	BCG 0h	1.194	3	8.4097E-02	4.8554E-02
Pair 8	BCG 0h	1.194	3	8.4097E-02	4.8554E-02
	9926 0h	.990	3	5.2700E-02	3.0427E-02
Pair 9	PL 0h	1.474	3	.11789	6.8061E-02
	9926 0h	.990	3	5.2700E-02	3.0427E-02
Pair 10	PL 8h	1.449	3	.14955	8.6341E-02
	BCG 8h	.728	3	2.8868E-03	1.6667E-03
Pair 11	BCG 8h	.728	3	2.8868E-03	1.6667E-03
	9926 8h	1.739	3	.22382	.12922
Pair 12	PL 8h	1.449	3	.14955	8.6341E-02
	9926 8h	1.739	3	.22382	.12922
Pair 13	PL 16h	1.279	3	7.4706E-02	4.3132E-02
	BCG 16h	.659	3	4.1509E-02	2.3965E-02
Pair 14	BCG 16h	.659	3	4.1509E-02	2.3965E-02
	9926 16h	.823	3	.11092	6.4043E-02
Pair 15	PL 16h	1.279	3	7.4706E-02	4.3132E-02
	9926 16h	.823	3	.11092	6.4043E-02

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PL 0h & PL 8h	3	.994	.067
Pair 2	PL 8h & PL 16h	3	.957	.187
Pair 3	BCG 0h & BCG 8h	3	-.982	.122
Pair 4	BCG 8h & BCG 16h	3	.855	.347
Pair 5	9926 0h & 9926 8h	3	.956	.190
Pair 6	9926 8h & 9926 16h	3	-.377	.754
Pair 7	PL 0h & BCG 0h	3	.989	.095
Pair 8	BCG 0h & 9926 0h	3	-.997	.049

Pair 9	PL 0h & 9926 0h	3	-.974	.144
Pair 10	PL 8h & BCG 8h	3	-.998	.040
Pair 11	BCG 8h & 9926 8h	3	1.000	.018
Pair 12	PL 8h & 9926 8h	3	-.999	.022
Pair 13	PL 16h & BCG 16h	3	-.951	.200
Pair 14	BCG 16h & 9926 16h	3	-.819	.389
Pair 15	PL 16h & 9926 16h	3	.601	.590

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PL 0h – PL 8h	.0253	.0346	.0200	-.0607	.1114	1.2665	2	.3329
Pair 2	PL 8h – PL 16h	.1697	.0810	.0467	-.0314	.3708	3.6299	2	.0682
Pair 3	BCG0h – BCG 8h	.4653	.0869	.0502	.2494	.6813	9.2713	2	.0114
Pair 4	BCG 8h – BCG 16h	.0693	.0391	.0226	-.0277	.1664	3.0738	2	.0915
Pair 5	9926 0h – 9926 8h	-.7497	.1741	.1005	-1.1822	-.3171	-7.4570	2	.0175
Pair 6	9926 8h – 9926 16h	.9160	.2848	.1644	.2086	1.6234	5.5712	2	.0307
Pair 7	PL 0h – BCG 0h	.2803	.0369	.0213	.1887	.3720	13.1599	2	.0057
Pair 8	BCG 0h – 9926 0h	.2040	.1367	.0789	-.1356	.5436	2.5848	2	.1227
Pair 9	PL 0h – 9926 0h	.4843	.1697	.0979	.0629	.9058	4.9447	2	.0385
Pair 10	PL 8h – BCG 8h	.7203	.1524	.0880	.3417	1.0990	8.1852	2	.0146
Pair 11	BCG 8h – 9926 8h	1.0110	.2209	.1276	-1.5598	-.4622	-7.9260	2	.0155
Pair 12	PL 8h – 9926 8h	-.2907	.3733	.2155	-1.2180	.6367	-1.3486	2	.3099
Pair 13	PL 16h – BCG 16h	.6200	.1149	.0663	.3346	.9054	9.3465	2	.0113

Pair 14	BCG16h – 9926 16h	-.1643	.1469	.0848	-.5292	.2005	-1.9381	2	.1922
Pair 15	PL 16h – 9926 16h	.4557	.0890	.0514	.2345	.6768	8.8660	2	.0125

7.8.2 T-Test Vaca 47

Input Data C:\Mis documentos\SILVIA\SPSS\V47 tipo y tiempo.sav

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PL 0h	.854	3	7.1898E-02	4.1510E-02
	PL 8h	1.065	3	.15758	9.0977E-02
Pair 2	PL 8h	1.065	3	.15758	9.0977E-02
	PL 16h	.682	3	.11431	6.5996E-02
Pair 3	BCG 0h	2.330	3	7.2629E-02	4.1932E-02
	BCG 8h	1.667	3	3.7072E-02	2.1404E-02
Pair 4	BCG 8h	1.667	3	3.7072E-02	2.1404E-02
	BCG 16h	1.671	3	5.5194E-02	3.1866E-02
Pair 5	9926 0h	.854	3	.14408	8.3187E-02
	9926 8h	1.778	3	7.0437E-02	4.0667E-02
Pair 6	9926 8h	1.778	3	7.0437E-02	4.0667E-02
	9926 16h	.642	3	3.2716E-02	1.8889E-02
Pair 7	PL 0h	.854	3	7.1898E-02	4.1510E-02
	BCG 0h	2.330	3	7.2629E-02	4.1932E-02
Pair 8	BCG 0h	2.330	3	7.2629E-02	4.1932E-02
	9926 0h	2.264	3	.14408	8.3187E-02
Pair 9	PL 0h	.854	3	7.1898E-02	4.1510E-02
	9926 0h	2.264	3	.14408	8.3187E-02
Pair 10	PL 8h	1.065	3	.15758	9.0977E-02
	BCG 8h	1.667	3	3.7072E-02	2.1404E-02
Pair 11	BCG 8h	1.667	3	3.7072E-02	2.1404E-02
	9926 8h	1.778	3	7.0437E-02	4.0667E-02

Pair 12	PL 8h	1.065	3	.15758	9.0977E-02
	9926 8h	1.778	3	7.0437E-02	4.0667E-02
Pair 13	PL 16h	.682	3	.11431	6.5996E-02
	BCG 16h	1.671	3	5.5194E-02	3.1866E-02
Pair 14	BCG 16h	1.671	3	5.5194E-02	3.1866E-02
	9926 16h	.642	3	3.2716E-02	1.8889E-02
Pair 15	PL 16h	.682	3	.11431	6.5996E-02
	9926 16h	.642	3	3.2716E-02	1.8889E-02

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PL 0h & PL 8h	3	-.267	.828
Pair 2	PL 8h & PL 16h	3	.996	.056
Pair 3	BCG 0h & BCG 8h	3	-.089	.943
Pair 4	BCG 8h & BCG 16h	3	-.164	.895
Pair 5	9926 0h & 9926 8h	3	-.723	.485
Pair 6	9926 8h & 9926 16h	3	-.997	.049
Pair 7	PL 0h & BCG 0h	3	-.975	.143
Pair 8	BCG 0h & 9926 0h	3	-.338	.781
Pair 9	PL 0h & 9926 0h	3	.539	.637
Pair 10	PL 8h & BCG 8h	3	-.919	.258
Pair 11	BCG 8h & 9926 8h	3	.366	.761
Pair 12	PL 8h & 9926 8h	3	.031	.980
Pair 13	PL 16h & BCG 16h	3	-.323	.791
Pair 14	BCG 16h & 9926 16h	3	.959	.182
Pair 15	PL 16h & 9926 16h	3	-.042	.973

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PL 0h – PL 8h	-.2103	.1898	.1096	-.6819	.2613	-1.9190	2	.1950

Pair 2	PL 8h – PL 16h	.3830	.0448	.0259	.2716	.4944	14.7929	2	.0045
Pair 3	BCG 0h – BCG 8h	.6633	.0844	.0487	.4536	.8731	13.6072	2	.0054
Pair 4	BCG 8h – BCG 16h	-.0040	.0714	.0412	-.1813	.1733	-.0971	2	.9315
Pair 5	9926 0h – 9926 8h	.4853	.2010	.1160	-.0140	.9847	4.1821	2	.0527
Pair 6	9926 8h – 9926 16h	1.1360	.1031	.0595	.8799	1.3921	19.0868	2	.0027
Pair 7	PL 0h – BCG 0h	1.4757	.1436	.0829	-1.8324	-1.1189	17.7975	2	.0031
Pair 8	BCG 0h - 9926 0h	.0663	.1819	.1050	-.3857	.5183	.6315	2	.5923
Pair 9	PL 0h – 9926 0h	1.4093	.1215	.0701	-1.7111	-1.1076	20.0976	2	.0025
Pair 10	PL 8h – BCG 8h	-.6020	.1922	.1110	-1.0794	-.1246	-5.4252	2	.0323
Pair 11	BCG 8h - 9926 8h	-.1117	.0665	.0384	-.2769	.0536	-2.9078	2	.1007
Pair 12	PL 8h – 9926 8h	-.7137	.1706	.0985	-1.1374	-.2899	-7.2461	2	.0185
Pair 13	PL 16h – BCG 16h	-.9890	.1421	.0820	-1.3420	-.6360	12.0562	2	.0068
Pair 14	BCG16h - 9926 16h	1.0283	.0255	.0147	.9649	1.0918	69.7364	2	.0002
Pair 15	PL 16h - 9926 16h	.0393	.1202	.0694	-.2593	.3380	.5667	2	.6281

7.8.3 T-Test Vaca 130

Input Data C:\Mis documentos\SILVIA\SPSS\V130 tipo y tiempo.sav

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PL 0h	.759	3	6.2984E-02	3.6364E-02
	PL 8h	.798	3	4.2218E-02	2.4374E-02

Pair 2	PL 8h	.798	3	4.2218E-02	2.4374E-02
	PL 16h	.634	3	2.3756E-02	1.3715E-02
Pair 3	BCG 0h	1.130	3	.10219	5.9000E-02
	BCG 8h	.794	3	5.2003E-02	3.0024E-02
Pair 4	BCG 8h	.794	3	5.2003E-02	3.0024E-02
	BCG 16h	.690	3	.19467	.11239
Pair 5	9926 0h	.843	3	2.7227E-02	1.5720E-02
	9926 8h	.828	3	6.1776E-02	3.5667E-02
Pair 6	9926 8h	.828	3	6.1776E-02	3.5667E-02
	9926 16h	.639	3	3.4073E-02	1.9672E-02
Pair 7	PL 0h	.759	3	6.2984E-02	3.6364E-02
	BCG 0h	1.130	3	.10219	5.9000E-02
Pair 8	BCG 0h	1.130	3	.10219	5.9000E-02
	9926 0h	.843	3	2.7227E-02	1.5720E-02
Pair 9	PL 0h	.759	3	6.2984E-02	3.6364E-02
	9926 0h	.843	3	2.7227E-02	1.5720E-02
Pair 10	PL 8h	.798	3	4.2218E-02	2.4374E-02
	BCG 8h	.794	3	5.2003E-02	3.0024E-02
Pair 11	BCG 8h	.794	3	5.2003E-02	3.0024E-02
	9926 8h	.828	3	6.1776E-02	3.5667E-02
Pair 12	PL 8h	.798	3	4.2218E-02	2.4374E-02
	9926 8h	.828	3	6.1776E-02	3.5667E-02
Pair 13	PL 16h	.634	3	2.3756E-02	1.3715E-02
	BCG 16h	.690	3	.19467	.11239
Pair 14	BCG 16h	.690	3	.19467	.11239
	9926 16h	.639	3	3.4073E-02	1.9672E-02
Pair 15	PL 16h	.634	3	2.3756E-02	1.3715E-02
	9926 16h	.639	3	3.4073E-02	1.9672E-02

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PL 0h & PL 8h	3	.869	.329
Pair 2	PL 8h & PL 16h	3	.459	.696

Pair 3	BCG 0h & BCG 8h	3	.860	.340
Pair 4	BCG 8h & BCG 16h	3	-.803	.407
Pair 5	9926 0h & 9926 8h	3	.975	.141
Pair 6	9926 8h & 9926 16h	3	.381	.751
Pair 7	PL 0h & BCG 0h	3	-.921	.254
Pair 8	BCG 0h & 9926 0h	3	-.975	.141
Pair 9	PL 0h & 9926 0h	3	.813	.396
Pair 10	PL 8h & BCG 8h	3	-.119	.924
Pair 11	BCG 8h & 9926 8h	3	-.860	.340
Pair 12	PL 8h & 9926 8h	3	.609	.583
Pair 13	PL 16h & BCG 16h	3	-.999	.027
Pair 14	BCG 16h & 9926 16h	3	-.705	.502
Pair 15	PL 16h & 9926 16h	3	.675	.529

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PL 0h – PL 8h	-.0387	.0336	.0194	-.1220	.0447	1.9956	2	.1841
Pair 2	PL 8h – PL 16h	.1633	.0378	.0218	.0695	.2571	7.4934	2	.0173
Pair 3	BCG 0h – BCG 8h	.3357	.0633	.0365	.1785	.4928	9.1899	2	.0116
Pair 4	BCG 8h – BCG 16h	.1043	.2384	.1377	-.4880	.6967	.7579	2	.5277
Pair 5	9926 0h – 9926 8h	.0143	.0357	.0206	-.0744	.1031	.6949	2	.5590
Pair 6	9926 8h – 9926 16h	.1893	.0581	.0335	.0451	.3336	5.6471	2	.0300
Pair 7	PL 0h – BCG 0h	-.3710	.1621	.0936	-.7736	.0316	3.9647	2	.0581
Pair 8	BCG 0h – 9926 0h	.2873	.1289	.0744	-.0328	.6075	3.8613	2	.0610
Pair 9	PL 0h – 9926 0h	-.0837	.0438	.0253	-.1925	.0252	3.3069	2	.0805

Pair 10	PL 8h – BCG 8h	.0033	.0708	.0409	-.1725	.1792	.0816	2	.9424
Pair 11	BCG 8h – 9926 8h	-.0340	.1098	.0634	-.3067	.2387	-.5365	2	.6453
Pair 12	PL 8h – 9926 8h	-.0307	.0492	.0284	-.1530	.0916	1.0788	2	.3935
Pair 13	PL 16h – BCG 16h	-.0557	.2184	.1261	-.5982	.4869	-.4415	2	.7020
Pair 14	BCG16h – 9926 16h	.0510	.2200	.1270	-.4956	.5976	.4015	2	.7269
Pair 15	PL 16h – 9926 16h	-.0047	.0252	.0145	-.0672	.0578	-.3212	2	.7785

7.8.4 T-Test Vaca 117

Input	Data	C:\Mis documentos\SILVIA\SPSS\117 tipo.sav
-------	------	--

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PL 0h	1.323	3	.11342	6.5483E-02
	PL 8h	.724	3	8.8085E-02	5.0856E-02
Pair 2	PL 8h	.724	3	8.8085E-02	5.0856E-02
	PL 16h	.742	3	5.2482E-02	3.0300E-02
Pair 3	BCG 0h	2.219	3	6.2067E-02	3.5834E-02
	BCG 8h	1.694	3	5.5018E-02	3.1765E-02
Pair 4	BCG 8h	1.694	3	5.5018E-02	3.1765E-02
	BCG 16h	1.363	3	.25315	.14616
Pair 5	9926 0h	.953	3	3.5679E-02	2.0599E-02
	9926 8h	.704	3	5.7611E-02	3.3262E-02
Pair 6	9926 8h	.704	3	5.7611E-02	3.3262E-02
	9926 16h	.903	3	6.7575E-02	3.9014E-02
Pair 7	PL 0h	1.323	3	.11342	6.5483E-02
	BCG 0h	2.219	3	6.2067E-02	3.5834E-02

Pair 8	BCG 0h	2.219	3	6.2067E-02	3.5834E-02
	9926 0h	.953	3	3.5679E-02	2.0599E-02
Pair 9	PL 0h	1.323	3	.11342	6.5483E-02
	9926 0h	.953	3	3.5679E-02	2.0599E-02
Pair 10	PL 8h	.724	3	8.8085E-02	5.0856E-02
	BCG 8h	1.694	3	5.5018E-02	3.1765E-02
Pair 11	BCG 8h	1.323	3	5.5018E-02	3.1765E-02
	9926 8h	.724	3	5.7611E-02	3.3262E-02
Pair 12	PL 8h	.724	3	8.8085E-02	5.0856E-02
	9926 8h	.742	3	5.7611E-02	3.3262E-02
Pair 13	PL 16h	2.219	3	5.2482E-02	3.0300E-02
	BCG 16h	1.694	3	.25315	.14616
Pair 14	BCG 16h	1.694	3	.25315	.14616
	9926 16h	1.363	3	6.7575E-02	3.9014E-02
Pair 15	PL 16h	.953	3	5.2482E-02	3.0300E-02
	9926 16h	.704	3	6.7575E-02	3.9014E-02

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PL 0h & PL 8h	3	-.578	.608
Pair 2	PL 8h & PL 16h	3	-.805	.405
Pair 3	BCG 0h & BCG 8h	3	-.905	.279
Pair 4	BCG 8h & BCG 16h	3	.943	.215
Pair 5	9926 0h & 9926 8h	3	-.974	.146
Pair 6	9926 8h & 9926 16h	3	-.840	.365
Pair 7	PL 0h & BCG 0h	3	.985	.111
Pair 8	BCG 0h & 9926 0h	3	-.727	.482
Pair 9	PL 0h & 9926 0h	3	-.596	.593
Pair 10	PL 8h & BCG 8h	3	.002	.999
Pair 11	BCG 8h & 9926 8h	3	-.854	.348
Pair 12	PL 8h & 9926 8h	3	.518	.653
Pair 13	PL 16h & BCG 16h	3	.291	.812
Pair 14	BCG 16h & 9926 16h	3	.952	.198

Pair 15	PL 16h & 9926 16h	3	.570	.614
---------	-------------------	---	------	------

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PL 0h – PL 8h	.5990	.1794	.1035	.1535	1.0445	5.7847	2	.0286
Pair 2	PL 8h – PL 16h	-.0177	.1340	.0774	-.3505	.3152	-.2284	2	.8406
Pair 3	BCG 0h – BCG 8h	.5253	.1143	.0660	.2414	.8092	7.9616	2	.0154
Pair 4	BCG 8h – BCG 16h	.3310	.2021	.1167	-.1710	.8330	2.8372	2	.1050
Pair 5	9926 0h – 9926 8h	.2490	.0927	.0535	.0187	.4793	4.6517	2	.0432
Pair 6	9926 8h – 9926 16h	-.1987	.1201	.0693	-.4970	.0997	-2.8650	2	.1033
Pair 7	PL 0h – BCG 0h	-.8963	.0534	.0308	-1.0290	-.7637	29.0690	2	.0012
Pair 8	BCG 0h - 9926 0h	1.2663	.0913	.0527	1.0394	1.4933	24.0111	2	.0017
Pair 9	PL 0h – 9926 0h	.3700	.1377	.0795	.0279	.7121	4.6541	2	.0432
Pair 10	PL 8h – BCG 8h	-.9700	.1038	.0599	-1.2278	-.7122	16.1907	2	.0038
Pair 11	BCG 8h – 9926 8h	.9900	.1084	.0626	.7206	1.2594	15.8115	2	.0040
Pair 12	PL 8h – 9926 8h	.0200	.0763	.0440	-.1695	.2095	.4542	2	.6942
Pair 13	PL 16h – BCG 16h	-.6213	.2431	.1404	-1.2252	-.0174	-4.4270	2	.0474
Pair 14	BCG16h – 9926 16h	.4603	.1899	.1097	-.0115	.9322	4.1976	2	.0523
Pair 15	PL 16h – 9926 16h	-.1610	.0572	.0330	-.3032	-.0188	-4.8721	2	.0396

7.8.5 T-Test Vaca 98

Input Data C:\Mis documentos\SILVIA\SPSS\V98 tipo y tiempo.sav

Paired Samples Statistics					
		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PL 0h	.295	3	1.1719E-02	6.7659E-03
	PL 8h	.295	3	2.9513E-02	1.7039E-02
Pair 2	PL 8h	.295	3	2.9513E-02	1.7039E-02
	PL 16h	.400	3	4.0017E-02	2.3104E-02
Pair 3	BCG 0h	.370	3	1.7388E-02	1.0039E-02
	BCG 8h	.202	3	1.6653E-02	9.6148E-03
Pair 4	BCG 8h	.202	3	1.6653E-02	9.6148E-03
	BCG 16h	.099	3	3.6056E-03	2.0817E-03
Pair 5	9926 0h	.442	3	2.5403E-02	1.4667E-02
	9926 8h	.304	3	2.6230E-02	1.5144E-02
Pair 6	9926 8h	.304	3	2.6230E-02	1.5144E-02
	9926 16h	.203	3	1.4012E-02	8.0898E-03
Pair 7	PL 0h	.295	3	1.1719E-02	6.7659E-03
	BCG 0h	.370	3	1.7388E-02	1.0039E-02
Pair 8	BCG 0h	.370	3	1.7388E-02	1.0039E-02
	9926 0h	.442	3	2.5403E-02	1.4667E-02
Pair 9	PL 0h	.295	3	1.1719E-02	6.7659E-03
	9926 0h	.442	3	2.5403E-02	1.4667E-02
Pair 10	PL 8h	.387	3	2.9513E-02	1.7039E-02
	BCG 8h	.202	3	1.6653E-02	9.6148E-03
Pair 11	BCG 8h	.202	3	1.6653E-02	9.6148E-03
	9926 8h	.304	3	2.6230E-02	1.5144E-02
Pair 12	PL 8h	.387	3	2.9513E-02	1.7039E-02
	9926 8h	.304	3	2.6230E-02	1.5144E-02
Pair 13	PL 16h	.400	3	4.0017E-02	2.3104E-02
	BCG 16h	.099	3	3.6056E-03	2.0817E-03

Pair 14	BCG 16h	.099	3	3.6056E-03	2.0817E-03
	9926 16h	.203	3	1.4012E-02	8.0898E-03
Pair 15	PL 16h	.400	3	4.0017E-02	2.3104E-02
	9926 16h	.203	3	1.4012E-02	8.0898E-03

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PL 0h & PL 8h	3	-.142	.910
Pair 2	PL 8h & PL 16h	3	1.000	.000
Pair 3	BCG 0h & BCG 8h	3	-.534	.641
Pair 4	BCG 8h & BCG 16h	3	.866	.333
Pair 5	9926 0h & 9926 8h	3	.792	.418
Pair 6	9926 8h & 9926 16h	3	.343	.777
Pair 7	PL 0h & BCG 0h	3	1.000	.020
Pair 8	BCG 0h & 9926 0h	3	.980	.129
Pair 9	PL 0h & 9926 0h	3	.985	.109
Pair 10	PL 8h & BCG 8h	3	-.741	.469
Pair 11	BCG 8h & 9926 8h	3	-.989	.095
Pair 12	PL 8h & 9926 8h	3	.633	.564
Pair 13	PL 16h & BCG 16h	3	-.977	.136
Pair 14	BCG 16h & 9926 16h	3	.317	.795
Pair 15	PL 16h & 9926 16h	3	-.511	.659

Paired Samples Test

		Paired Differences					T	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PL 0h – PL 8h	-.0923	.0333	.0192	-.1750	-.0097	-4.8081	2	.0406
Pair 2	PL 8h – PL 16h	-.0127	.0105	.0061	-.0388	.0134	-2.0887	2	.1720
Pair 3	BCG 0h – BCG 8h	.1680	.0298	.0172	.0939	.2421	9.7593	2	.0103

Pair 4	BCG 8h – BCG 16h	.1033	.0137	.0079	.0694	.1372	13.1116	2	.0058
Pair 5	9926 0h – 9926 8h	.1377	.0167	.0096	.0963	.1790	14.3182	2	.0048
Pair 6	9926 8h - 9926 16h	.1007	.0251	.0145	.0382	.1631	6.9338	2	.0202
Pair 7	PL 0h – BCG 0h	.0757	.0057	.0033	-.0898	-.0615	23.0484	2	.0019
Pair 8	BCG 0h - 9926 0h	.0713	.0091	.0052	-.0939	-.0488	13.6165	2	.0054
Pair 9	PL 0h – 9926 0h	.1470	.0140	.0081	-.1818	-.1122	18.1865	2	.0030
Pair 10	PL 8h – BCG 8h	.1847	.0433	.0250	.0771	.2923	7.3840	2	.0179
Pair 11	BCG 8h - 9926 8h	.1017	.0428	.0247	-.2079	.0046	-4.1171	2	.0542
Pair 12	PL 8h – 9926 8h	.0830	.0241	.0139	.0232	.1428	5.9745	2	.0269
Pair 13	PL 16h – BCG 16h	.3007	.0435	.0251	.1925	.4088	11.9588	2	.0069
Pair 14	BCG16h - 9926 16h	.1043	.0133	.0077	-.1374	-.0713	13.5703	2	.0054
Pair 15	PL 16h - 9926 16h	.1963	.0487	.0281	.0754	.3173	6.9847	2	.0199

7.8.6 T-Test Vaca 99

Input Data C:\Mis documentos\SILVIA\SPSS\99 tipo y tiempo.sav

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	PL 0h	1.008	3	5.5866E-02	3.2254E-02
	PL 8h	.950	3	.13273	7.6632E-02
Pair 2	PL 8h	.950	3	.13273	7.6632E-02
	PL 16h	1.201	3	.25927	.14969
Pair 3	BCG 0h	1.933	3	.34172	.19729
	BCG 8h	1.900	3	.14018	8.0934E-02

Pair 4	BCG 8h	1.900	3	.14018	8.0934E-02
	BCG 16h	.996	3	8.8489E-02	5.1089E-02
Pair 5	9926 0h	1.093	3	.14752	8.5169E-02
	9926 8h	.636	3	8.1684E-02	4.7160E-02
Pair 6	9926 8h	.636	3	8.1684E-02	4.7160E-02
	9926 16h	.660	3	6.1256E-02	3.5366E-02
Pair 7	PL 0h	1.008	3	5.5866E-02	3.2254E-02
	BCG 0h	1.933	3	.34172	.19729
Pair 8	BCG 0h	1.933	3	.34172	.19729
	9926 0h	1.093	3	.14752	8.5169E-02
Pair 9	PL 0h	1.008	3	5.5866E-02	3.2254E-02
	9926 0h	1.093	3	.14752	8.5169E-02
Pair 10	PL 8h	.950	3	.13273	7.6632E-02
	BCG 8h	1.900	3	.14018	8.0934E-02
Pair 11	BCG 8h	1.900	3	.14018	8.0934E-02
	9926 8h	.636	3	8.1684E-02	4.7160E-02
Pair 12	PL 8h	.950	3	.13273	7.6632E-02
	9926 8h	.636	3	8.1684E-02	4.7160E-02
Pair 13	PL 16h	1.201	3	.25927	.14969
	BCG 16h	.996	3	8.8489E-02	5.1089E-02
Pair 14	BCG 16h	.996	3	8.8489E-02	5.1089E-02
	9926 16h	.660	3	6.1256E-02	3.5366E-02
Pair 15	PL 16h	1.201	3	.25927	.14969
	9926 16h	.660	3	6.1256E-02	3.5366E-02

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	PL 0h & PL 8h	3	-.237	.848
Pair 2	PL 8h & PL 16h	3	-.995	.061
Pair 3	BCG 0h & BCG 8h	3	.974	.145
Pair 4	BCG 8h & BCG 16h	3	.759	.451
Pair 5	9926 0h & 9926 8h	3	-.808	.401
Pair 6	9926 8h & 9926 16h	3	.332	.785

Pair 7	PL 0h & BCG 0h	3	.487	.676
Pair 8	BCG 0h & 9926 0h	3	-.660	.541
Pair 9	PL 0h & 9926 0h	3	-.977	.136
Pair 10	PL 8h & BCG 8h	3	.868	.331
Pair 11	BCG 8h & 9926 8h	3	-.136	.913
Pair 12	PL 8h & 9926 8h	3	-.610	.582
Pair 13	PL 16h & BCG 16h	3	-.425	.720
Pair 14	BCG 16h & 9926 16h	3	.973	.149
Pair 15	PL 16h & 9926 16h	3	-.623	.572

Paired Samples Test

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	PL 0h – PL 8h	.0577	.1557	.0899	-.3292	.4445	.6414	2	.5870
Pair 2	PL 8h – PL 16h	-.2510	.3916	.2261	-1.2238	.7218	-1.1102	2	.3825
Pair 3	BCG 0h – BCG 8h	.0333	.2076	.1198	-.4823	.5490	.2781	2	.8070
Pair 4	BCG 8h – BCG 16h	.9043	.0930	.0537	.6734	1.1353	16.8500	2	.0035
Pair 5	9926 0h – 9926 8h	.4570	.2189	.1264	-.0867	1.0007	3.6166	2	.0687
Pair 6	9926 8h – 9926 16h	-.0233	.0843	.0487	-.2327	.1861	-.4795	2	.6789
Pair 7	PL 0h – BCG 0h	-.9253	.3183	.1838	-1.7160	-.1347	-5.0354	2	.0372
Pair 8	BCG 0h - 9926 0h	.8400	.4529	.2615	-.2850	1.9650	3.2126	2	.0848
Pair 9	PL 0h – 9926 0h	-.0853	.2025	.1169	-.5883	.4176	-.7300	2	.5413
Pair 10	PL 8h – BCG 8h	-.9497	.0705	.0407	-1.1248	-.7745	23.3313	2	.0018
Pair 11	BCG 8h – 9926 8h	1.2637	.1716	.0991	.8374	1.6899	12.7551	2	.0061

Pair 12	PL 8h – 9926 8h	.3140	.1937	.1118	-.1672	.7952	2.8076	2	.1069
Pair 13	PL 16h – BCG 16h	.2057	.3075	.1775	-.5582	.9695	1.1584	2	.3663
Pair 14	BCG16h – 9926 16h	.3360	.0322	.0186	.2560	.4160	18.0809	2	.0030
Pair 15	PL 16h – 9926 16h	.5417	.3013	.1739	-.2067	1.2901	3.1141	2	.0895

7.9 RESULTADOS MÉTODO COMPARATIVO DE C_T (Réplica Biológica):

7.9.1 VACA 47:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v47 Ni 0h	17.79	GAPDH v47 NI 0h	17.66	0.13
TB10 v47 Ni 0h	17.42	GAPDH v47 NI 0h	17.89	-0.47
TB10 v47 Ni 0h	17.35	GAPDH v47 NI 0h	18.19	-0.84
TB10 v47 PL 0h	17.99	GAPDH v47 PL 0h	17.96	0.03
TB10 v47 PL 0h	18.02	GAPDH v47 PL 0h	18.07	-0.05
TB10 v47 PL 0h	17.78	GAPDH v47 PL 0h	18.31	-0.53
TB10 v47 PL 8h	18.09	GAPDH v47 PL 8h	17.98	0.11
TB10 v47 PL 8h	17.72	GAPDH v47 PL 8h	18.46	-0.74
TB10 v47 PL 8h	17.76	GAPDH v47 PL 8h	18.58	-0.82
TB10 v47 PL 16h	18.43	GAPDH v47 PL 16h	17.69	0.74
TB10 v47 PL 16h	18.19	GAPDH v47 PL 16h	18.29	-0.1
TB10 v47 PL 16h	18.15	GAPDH v47 PL 16h	18.25	-0.1
TB10 v47 BCG 0h	17.26	GAPDH v47 BCG 0h	18.81	-1.55
TB10 v47 BCG 0h	17.12	GAPDH v47 BCG 0h	18.97	-1.85
TB10 v47 BCG 0h	17.06	GAPDH v47 BCG 0h	19.03	-1.97
TB10 v47 BCG 8h	17.51	GAPDH v47 BCG 8h	18.55	-1.04
TB10 v47 BCG 8h	17.39	GAPDH v47 BCG 8h	18.6	-1.21
TB10 v47 BCG 8h	17.32	GAPDH v47 BCG 8h	18.79	-1.47
TB10 v47 BCG 16h	18.33	GAPDH v47 BCG 16h	19.36	-1.03
TB10 v47 BCG 16h	18.18	GAPDH v47 BCG 16h	19.55	-1.37
TB10 v47 BCG 16h	18.18	GAPDH v47 BCG 16h	19.77	-1.59
TB10 v47 9926 0h	17.15	GAPDH v47 9926 0h	19.25	-2.1
TB10 v47 9926 0h	17.21	GAPDH v47 9926 0h	18.72	-1.51
TB10 v47 9926 0h	17.38	GAPDH v47 9926 0h	19.03	-1.65
TB10 v47 9926 8h	17.44	GAPDH v47 9926 8h	18.8	-1.36
TB10 v47 9926 8h	17.62	GAPDH v47 9926 8h	19.16	-1.54
TB10 v47 9926 8h	17.85	GAPDH v47 9926 8h	19.14	-1.29
TB10 v47 9926 16h	19.43	GAPDH v47 9926 16h	19.25	0.18
TB10 v47 9926 16h	19.22	GAPDH v47 9926 16h	19.08	0.14
TB10 v47 9926 16h	19.17	GAPDH v47 9926 16h	19.01	0.16

Prom DCT NI 0h

-0.393

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
0.423	-0.423	0.746	
0.343	-0.343	0.788	0.193
-0.137	0.137	1.099	
0.503	-0.503	0.705	
-0.347	0.347	1.272	0.350
-0.427	0.427	1.344	
1.133	-1.133	0.456	
0.293	-0.293	0.816	0.208
0.293	-0.293	0.816	
-1.157	1.157	2.229	
-1.457	1.457	2.745	0.385
-1.577	1.577	2.983	
-0.647	0.647	1.566	
-0.817	0.817	1.761	0.275
-1.077	1.077	2.109	
-0.637	0.637	1.555	
-0.977	0.977	1.968	0.370
-1.197	1.197	2.292	
-1.707	1.707	3.264	
-1.117	1.117	2.168	0.579
-1.257	1.257	2.389	
-0.967	0.967	1.954	
-1.147	1.147	2.214	0.183
-0.897	0.897	1.862	
0.573	-0.573	0.672	
0.533	-0.533	0.691	0.009
0.553	-0.553	0.681	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	0.878
BCG 0h	2.652
9926 0h	2.607
PL 8h	1.107
BCG 8h	1.812
9926 8h	2.010
PL 16h	0.636
BCG 16h	1.938
9926 16h	0.681

7.9.2 VACA 99:

Detector		Reporter		
CURVA STANDARD		SYBR		
ACTINA				
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v99 NI 0h	18.561	GAPDH v99 NI 0	18.395	0.167
TB10 v99 NI 0h	18.373	GAPDH v99 NI 0	18.252	0.121
TB10 v99 NI 0h	18.196	GAPDH v99 NI 0	18.187	0.008
TB10 v99 PL 0h	18.771	GAPDH v99 PL 0	18.131	0.639
TB10 v99 PL 0h	18.488	GAPDH v99 PL 0	18.287	0.201
TB10 v99 PL 0h	18.181	GAPDH v99 PL 0	18.735	-0.554
TB10 v99 PL 8h	18.871	GAPDH v99 PL 8	18.021	0.850
TB10 v99 PL 8h	18.459	GAPDH v99 PL 8	18.369	0.091
TB10 v99 PL 8h	18.433	GAPDH v99 PL 8	18.847	-0.414
TB10 v99 PL 16h	18.692	GAPDH v99 PL 16	18.531	0.160
TB10 v99 PL 16h	18.403	GAPDH v99 PL 16	18.903	-0.500
TB10 v99 PL 16h	18.246	GAPDH v99 PL 16	18.666	-0.420
TB10 v99 BCG 0h	17.613	GAPDH v99 BCG 0	18.219	-0.607
TB10 v99 BCG 0h	17.715	GAPDH v99 BCG 0	18.438	-0.723
TB10 v99 BCG 0h	17.740	GAPDH v99 BCG 0	18.909	-1.169
TB10 v99 BCG 8h	17.721	GAPDH v99 BCG 8	18.411	-0.691
TB10 v99 BCG 8h	17.867	GAPDH v99 BCG 8	18.643	-0.776
TB10 v99 BCG 8h	18.008	GAPDH v99 BCG 8	18.942	-0.934
TB10 v99 BCG 16h	18.136	GAPDH v99 BCG 16	18.136	0.000
TB10 v99 BCG 16h	18.277	GAPDH v99 BCG 16	18.277	0.000
TB10 v99 BCG 16h	18.660	GAPDH v99 BCG 16	18.660	0.000
TB10 v99 9926 0h	17.958	GAPDH v99 9926 0	17.976	-0.018
TB10 v99 9926 0h	18.012	GAPDH v99 9926 0	18.252	-0.240
TB10 v99 9926 0h	18.497	GAPDH v99 9926 0	18.366	0.131
TB10 v99 9926 8h	18.734	GAPDH v99 9926 8	18.100	0.633
TB10 v99 9926 8h	19.291	GAPDH v99 9926 8	18.327	0.964
TB10 v99 9926 8h	19.435	GAPDH v99 9926 8	18.749	0.686
TB10 v99 9926 16h	18.970	GAPDH v99 9926 16	18.155	0.816
TB10 v99 9926 16h	19.497	GAPDH v99 9926 16	18.696	0.801
TB10 v99 9926 16h	19.457	GAPDH v99 9926 16	18.992	0.465

Prom DCT NI 0h
0.099

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
0.541	-0.541	0.688	0.457
0.102	-0.102	0.932	
-0.652	0.652	1.572	
0.751	-0.751	0.594	
-0.008	0.008	1.006	0.416
-0.513	0.513	1.427	
0.062	-0.062	0.958	
-0.599	0.599	1.514	0.300
-0.519	0.519	1.433	
-0.705	0.705	1.630	
-0.822	0.822	1.768	0.415
-1.267	1.267	2.407	
-0.789	0.789	1.728	
-0.875	0.875	1.834	0.162
-1.033	1.033	2.046	
-0.099	0.099	1.071	
-0.099	0.099	1.071	0.000
-0.099	0.099	1.071	
-0.116	0.116	1.084	
-0.338	0.338	1.264	0.145
0.032	-0.032	0.978	
0.535	-0.535	0.690	
0.865	-0.865	0.549	0.075
0.587	-0.587	0.666	
0.717	-0.717	0.608	
0.702	-0.702	0.615	0.095
0.366	-0.366	0.776	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	1.064
BCG 0h	1.935
9926 0h	1.109
PL 8h	1.009
BCG 8h	1.869
9926 8h	0.635
PL 16h	1.302
BCG 16h	1.071
9926 16h	0.666

7.9.3 VACA 117:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR			
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT	
TB10 v117 Ni 0h	17.561	v117 GAPDH Ni 0	18.114	-0.554	
TB10 v117 Ni 0h	17.248	v117 GAPDH Ni 0	18.334	-1.086	
TB10 v117 Ni 0h	17.104	v117 GAPDH Ni 0	18.566	-1.462	
TB10 v117 PL 0h	16.809	v117 GAPDH PL 0	18.363	-1.554	
TB10 v117 PL 0h	17.192	v117 GAPDH PL 0	18.355	-1.163	
TB10 v117 PL 0h	17.084	v117 GAPDH PL 0	18.665	-1.580	
TB10 v117 PL 8h	17.380	v117 GAPDH PL 8	18.131	-0.751	
TB10 v117 PL 8h	17.050	v117 GAPDH PL 8	18.137	-1.087	
TB10 v117 PL 8h	17.220	v117 GAPDH PL 8	18.884	-1.664	
TB10 v 117 PL 16h	17.972	v117 GAPDH PL 16	18.116	-0.145	
TB10 v 117 PL 16h	17.684	v117 GAPDH PL 16	18.485	-0.801	
TB10 v 117 PL 16h	17.549	v117 GAPDH PL 16	18.427	-0.877	
TB10 v117 BCG 0h	16.526	v117 GAPDH BCG 0	18.651	-2.125	
TB10 v117 BCG 0h	16.469	v117 GAPDH BCG 0	18.946	-2.476	
TB10 v117 BCG 0h	16.392	v117 GAPDH BCG 0	18.937	-2.545	
TB10 v117 BCG 8h	16.570	v117 GAPDH BCG 8	18.226	-1.656	
TB10 v117 BCG 8h	16.435	v117 GAPDH BCG 8	18.333	-1.898	
TB10 v117 BCG 8h	16.350	v117 GAPDH BCG 8	18.269	-1.919	
TB10 v117 BCG 16h	17.271	v117 GAPDH BCG 16	18.272	-1.001	
TB10 v117 BCG 16h	16.986	v117 GAPDH BCG 16	18.485	-1.499	
TB10 v117 BCG 16h	16.564	v117 GAPDH BCG 16	18.382	-1.818	
TB10 v117 9926 0h	17.210	v117 GAPDH 9926 0	18.223	-1.013	
TB10 v117 9926 0h	17.310	v117 GAPDH 9926 0	18.225	-0.915	
TB10 v117 9926 0h	17.581	v117 GAPDH 9926 0	18.614	-1.033	
TB10 v117 9926 8h	18.046	v117 GAPDH 9926 8	18.428	-0.382	
TB10 v117 9926 8h	18.098	v117 GAPDH 9926 8	18.791	-0.693	
TB10 v117 9926 8h	18.349	v117 GAPDH 9926 8	18.929	-0.580	
TB10 v117 9926 16h	17.098	v117 GAPDH 9926 16	18.079	-0.982	
TB10 v117 9926 16h	17.521	v117 GAPDH 9926 16	18.280	-0.759	
TB10 v117 9926 16h	17.597	v117 GAPDH 9926 16	18.566	-0.969	

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Prom DCT NI 0h

-1.034

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
-0.520	0.520	1.434	
-0.129	0.129	1.093	0.205
-0.546	0.546	1.460	
0.283	-0.283	0.822	
-0.053	0.053	1.037	0.373
-0.630	0.630	1.548	
0.889	-0.889	0.540	
0.233	-0.233	0.851	0.194
0.157	-0.157	0.897	
-1.091	1.091	2.130	
-1.442	1.442	2.718	0.383
-1.511	1.511	2.850	
-0.622	0.622	1.539	
-0.864	0.864	1.820	0.171
-0.885	0.885	1.847	
0.033	-0.033	0.977	
-0.465	0.465	1.380	0.373
-0.784	0.784	1.722	
0.021	-0.021	0.986	
0.119	-0.119	0.921	0.042
0.001	-0.001	0.999	
0.652	-0.652	0.637	
0.341	-0.341	0.790	0.077
0.454	-0.454	0.730	
0.052	-0.052	0.965	
0.275	-0.275	0.826	0.077
0.065	-0.065	0.956	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	1.329
BCG 0h	2.566
9926 0h	0.969
PL 8h	1.136
BCG 8h	1.735
9926 8h	0.719
PL 16h	0.763
BCG 16h	1.360
9926 16h	0.916

7.9.4 VACA 98:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v98 Ni 0h	15.866	v98 GAPDH Ni 0	18.979	-3.112
TB10 v98 Ni 0h	15.818	v98 GAPDH Ni 0	18.772	-2.954
TB10 v98 Ni 0h	15.892	v98 GAPDH Ni 0	18.840	-2.948
TB10 v98 PL 0h	17.314	v98 GAPDH PL 0	18.169	-0.855
TB10 v98 PL 0h	17.155	v98 GAPDH PL 0	18.268	-1.113
TB10 v98 PL 0h	17.066	v98 GAPDH PL 0	18.575	-1.509
TB10 v98 PL 8h	16.936	v98 GAPDH PL 8	18.094	-1.158
TB10 v98 PL 8h	16.837	v98 GAPDH PL 8	18.479	-1.641
TB10 v98 PL 8h	16.685	v98 GAPDH PL 8	18.474	-1.789
TB10 v 98 PL 16h	17.116	v98 GAPDH PL 16	18.192	-1.076
TB10 v 98 PL 16h	16.870	v98 GAPDH PL 16	18.761	-1.892
TB10 v 98 PL 16h	16.801	v98 GAPDH PL 16	18.596	-1.796
TB10 v98 BCG 0h	17.067	v98 GAPDH BCG 0	18.320	-1.253
TB10 v98 BCG 0h	16.875	v98 GAPDH BCG 0	18.487	-1.612
TB10 v98 BCG 0h	16.810	v98 GAPDH BCG 0	18.659	-1.849
TB10 v98 BCG 8h	17.767	v98 GAPDH BCG 8	18.163	-0.396
TB10 v98 BCG 8h	17.635	v98 GAPDH BCG 8	18.179	-0.544
TB10 v98 BCG 8h	17.421	v98 GAPDH BCG 8	18.248	-0.827
TB10 v98 BCG 16h	18.956	v98 GAPDH BCG 16	18.551	0.406
TB10 v98 BCG 16h	18.705	v98 GAPDH BCG 16	18.743	-0.038
TB10 v98 BCG 16h	18.480	v98 GAPDH BCG 16	18.686	-0.206
TB10 v98 9926 0h	17.086	v98 GAPDH 9926 0	18.603	-1.517
TB10 v98 9926 0h	16.878	v98 GAPDH 9926 0	18.603	-1.726
TB10 v98 9926 0h	16.928	v98 GAPDH 9926 0	18.953	-2.025
TB10 v98 9926 8h	17.075	v98 GAPDH 9926 8	18.149	-1.073
TB10 v98 9926 8h	17.126	v98 GAPDH 9926 8	18.376	-1.250
TB10 v98 9926 8h	17.262	v98 GAPDH 9926 8	18.611	-1.348
TB10 v98 9926 16h	17.456	v98 GAPDH 9926 16	18.105	-0.650
TB10 v98 9926 16h	17.886	v98 GAPDH 9926 16	18.369	-0.483
TB10 v98 9926 16h	18.124	v98 GAPDH 9926 16	18.584	-0.460

Prom DCT NI 0h
-3.005

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
2.149	-2.149	0.225	
1.891	-1.891	0.270	0.066
1.495	-1.495	0.355	
1.847	-1.847	0.278	
1.363	-1.363	0.389	0.079
1.216	-1.216	0.431	
1.928	-1.928	0.263	
1.113	-1.113	0.462	0.108
1.209	-1.209	0.433	
1.751	-1.751	0.297	
1.392	-1.392	0.381	0.076
1.156	-1.156	0.449	
2.609	-2.609	0.164	
2.461	-2.461	0.182	0.029
2.178	-2.178	0.221	
3.410	-3.410	0.094	
2.967	-2.967	0.128	0.025
2.799	-2.799	0.144	
1.488	-1.488	0.357	
1.279	-1.279	0.412	0.076
0.979	-0.979	0.507	
1.931	-1.931	0.262	
1.755	-1.755	0.296	0.028
1.656	-1.656	0.317	
2.355	-2.355	0.195	
2.522	-2.522	0.174	0.013
2.544	-2.544	0.171	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	0.283
BCG 0h	0.376
9926 0h	0.460
PL 8h	0.366
BCG 8h	0.189
9926 8h	0.292
PL 16h	0.348
BCG 16h	0.122
9926 16h	0.180

7.9.5 VACA 75:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TB10 v75 Ni 0h	17.799	GAPDH v75 NI 0h	18.449	-0.650
TB10 v75 Ni 0h	17.375	GAPDH v75 NI 0h	18.410	-1.035
TB10 v75 Ni 0h	17.465	GAPDH v75 NI 0h	18.611	-1.146
TB10 v75 PL 0h	17.302	GAPDH v75 PL 0h	18.258	-0.956
TB10 v75 PL 0h	17.233	GAPDH v75 PL 0h	18.101	-0.868
TB10 v75 PL 0h	17.061	GAPDH v75 PL 0h	18.540	-1.479
TB10 v75 PL 8h	17.218	GAPDH v75 PL 8h	18.263	-1.045
TB10 v75 PL 8h	17.246	GAPDH v75 PL 8h	18.230	-0.985
TB10 v75 PL 8h	17.357	GAPDH v75 PL 8h	18.612	-1.255
TB10 v75 PL 16h	17.503	GAPDH v75 PL 16h	18.218	-0.715
TB10 v75 PL 16h	17.453	GAPDH v75 PL 16h	18.260	-0.806
TB10 v75 PL 16h	17.358	GAPDH v75 PL 16h	18.530	-1.172
TB10 v75 BCG 0h	17.250	GAPDH v75 BCG 0h	18.010	-0.760
TB10 v75 BCG 0h	17.280	GAPDH v75 BCG 0h	18.180	-0.900
TB10 v75 BCG 0h	17.340	GAPDH v75 BCG 0h	18.410	-1.070
TB10 v75 BCG 8h	18.319	GAPDH v75 BCG 8h	18.209	0.110
TB10 v75 BCG 8h	18.156	GAPDH v75 BCG 8h	18.211	-0.055
TB10 v75 BCG 8h	18.155	GAPDH v75 BCG 8h	18.407	-0.252
TB10 v75 BCG 16h	18.744	GAPDH v75 BCG 16h	18.218	0.527
TB10 v75 BCG 16h	18.519	GAPDH v75 BCG 16h	18.562	-0.042
TB10 v75 BCG 16h	18.289	GAPDH v75 BCG 16h	18.539	-0.250
TB10 v75 9926 0h	17.500	GAPDH v75 9926 0h	18.000	-0.500
TB10 v75 9926 0h	17.610	GAPDH v75 9926 0h	18.000	-0.390
TB10 v75 9926 0h	17.660	GAPDH v75 9926 0h	18.160	-0.500
TB10 v75 9926 8h	17.139	GAPDH v75 9926 8h	18.126	-0.988
TB10 v75 9926 8h	16.853	GAPDH v75 9926 8h	18.232	-1.379
TB10 v75 9926 8h	16.765	GAPDH v75 9926 8h	18.270	-1.506
TB10 v75 9926 16h	18.291	GAPDH v75 9926 16h	18.743	-0.452
TB10 v75 9926 16h	18.396	GAPDH v75 9926 16h	18.299	0.097
TB10 v75 9926 16h	17.683	GAPDH v75 9926 16h	18.057	-0.373

Prom DCT NI 0h
-0.944

DDCT	DDCT Neg	Expresion Relativa	DS
-0.013	0.013	1.009	
0.076	-0.076	0.949	0.273
-0.535	0.535	1.449	
-0.101	0.101	1.073	
-0.041	0.041	1.029	0.112
-0.311	0.311	1.241	
0.229	-0.229	0.853	
0.137	-0.137	0.909	0.170
-0.228	0.228	1.171	
0.183	-0.183	0.881	
0.044	-0.044	0.970	0.106
-0.127	0.127	1.092	
1.053	-1.053	0.482	
0.889	-0.889	0.540	0.069
0.691	-0.691	0.619	
1.470	-1.470	0.361	
0.901	-0.901	0.535	0.131
0.694	-0.694	0.618	
0.444	-0.444	0.735	
0.554	-0.554	0.681	0.031
0.444	-0.444	0.735	
-0.044	0.044	1.031	
-0.435	0.435	1.352	0.230
-0.562	0.562	1.477	
0.492	-0.492	0.711	
1.041	-1.041	0.486	0.121
0.570	-0.570	0.674	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	1.136
BCG 0h	0.981
9926 0h	0.717
PL 8h	1.114
BCG 8h	0.547
9926 8h	1.287
PL 16h	1.012
BCG 16h	0.505
9926 16h	0.624

7.9.6 VACA 130:

Detector CURVA STANDARD ACTINA		Reporter SYBR		
SampleName	Ct	SampleName	Ct	Delta CT
TIMO v130 NI 0h	16.790	v130 GAPDH NI 0h	18.010	-1.220
TIMO v130 NI 0h	16.930	v130 GAPDH NI 0h	18.290	-1.360
TIMO v130 NI 0h	17.310	v130 GAPDH NI 0h	18.420	-1.110
TB10 v130 PL 0h	17.552	v130 GAPDH PL 0h	18.250	-0.640
TB10 v130 PL 0h	17.378	v130 GAPDH PL 0h	18.345	-0.872
TB10 v130 PL 0h	17.365	v130 GAPDH PL 0h	18.005	-0.793
TB10 v130 PL 8h	17.921	v130 GAPDH PL 8h	18.457	-0.884
TB10 v130 PL 8h	17.488	v130 GAPDH PL 8h	18.782	-0.970
TB10 v130 PL 8h	17.459	v130 GAPDH PL 8h	18.343	-0.861
TB10 v130 PL 16h	17.614	v130 GAPDH PL 16h	18.065	-0.548
TB10 v130 PL 16h	17.457	v130 GAPDH PL 16h	18.005	-0.549
TB10 v130 PL 16h	17.513	v130 GAPDH PL 16h	18.062	-0.451
TB10 v130 BCG 0h	17.217	v130 GAPDH BCG 0h	18.597	-1.510
TB10 v130 BCG 0h	17.096	v130 GAPDH BCG 0h	18.366	-1.271
TB10 v130 BCG 0h	16.775	v130 GAPDH BCG 0h	18.285	-1.379
TB10 v130 BCG 8h	17.869	v130 GAPDH BCG 8h	18.633	-0.948
TB10 v130 BCG 8h	17.583	v130 GAPDH BCG 8h	18.205	-0.816
TB10 v130 BCG 8h	17.256	v130 GAPDH BCG 8h	18.399	-0.764
TB10 v130 BCG 16h	17.660	v130 GAPDH BCG 16h	18.945	-0.430
TB10 v130 BCG 16h	17.819	v130 GAPDH BCG 16h	18.090	-0.287
TB10 v130 BCG 16h	17.879	v130 GAPDH BCG 16h	18.107	-1.066
TB10 v130 9926 0h	17.263	v130 GAPDH 9926 0h	18.142	-0.879
TB10 v130 9926 0h	17.540	v130 GAPDH 9926 0h	18.616	-0.960
TB10 v130 9926 0h	17.630	v130 GAPDH 9926 0h	18.500	-0.986
TB10 v130 9926 8h	17.534	v130 GAPDH 9926 8h	18.363	-0.829
TB10 v130 9926 8h	17.642	v130 GAPDH 9926 8h	18.713	-1.071
TB10 v130 9926 8h	17.804	v130 GAPDH 9926 8h	18.847	-1.043
TB10 v130 9926 16h	17.847	v130 GAPDH 9926 16h	18.023	-0.496
TB10 v130 9926 16h	17.527	v130 GAPDH 9926 16h	18.323	-0.610
TB10 v130 9926 16h	17.613	v130 GAPDH 9926 16h	18.223	-0.476

Prom DCT NI 0h
-1.23

DDCT	DDCT Neg	Expresión Relativa	DS
0.590	-0.590	0.664	
0.358	-0.358	0.780	0.059
0.437	-0.437	0.739	
0.346	-0.346	0.787	
0.261	-0.261	0.835	0.032
0.369	-0.369	0.774	
0.682	-0.682	0.623	
0.681	-0.681	0.624	0.024
0.779	-0.779	0.583	
-0.280	0.280	1.214	
-0.041	0.041	1.029	0.093
-0.149	0.149	1.109	
0.282	-0.282	0.823	
0.414	-0.414	0.751	0.051
0.466	-0.466	0.724	
0.800	-0.800	0.574	
0.943	-0.943	0.520	0.201
0.164	-0.164	0.892	
0.351	-0.351	0.784	
0.270	-0.270	0.829	0.031
0.244	-0.244	0.845	
0.401	-0.401	0.757	
0.159	-0.159	0.896	0.075
0.187	-0.187	0.879	
0.734	-0.734	0.601	
0.620	-0.620	0.651	0.031
0.754	-0.754	0.593	

PROMEDIO EXP. REL.

PL 0h	0.728
BCG 0h	1.117
9926 0h	0.819
PL 8h	0.799
BCG 8h	0.766
9926 8h	0.844
PL 16h	0.610
BCG 16h	0.662
9926 16h	0.615