



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MUESTRAS DE
ANIMALES DESAFIADOS CON *M. BOVIS* Y
ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE RT-PCR”**

S E R V I C I O S O C I A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
LAURA PATRICIA JUÁREZ JUÁREZ

Responsable del Programa:

M.V.Z. Rafael Pérez González

Integrantes del Programa:

Dr. Fernando Osnaya Gallardo

M.V.Z. Javier Hernández Balderas



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen Garcia Mijares
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **el Servicio Social**

Producción Bovina "Extracción de RNA a partir de muestras de
 animales desafiados con M. bovis y estandarización de RT-PCR

que presenta la pasante: Laura Patricia Juárez Juárez
 con número de cuenta: 09957787-8 para obtener el TITULO de:
 Medica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Marzo de 2006

- PRESIDENTE MVZ. Marco Antonio Fajardo Román
- VOCAL M.A. Antonio Gómez Alcantara
- SECRETARIO MVZ. Rafael Pérez González
- PRIMER SUPLENTE QFB. Juana A. Alquicira Camacho
- SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Graciela Castañeda Aceves

El Servicio Social se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. (INIFAP) como parte de las investigaciones del proyecto “Tuberculosis Bovina”.



Trabajo financiado por CONACYT. Proyecto No. D 43244-Z y G34799-B, con beca del proyecto G34799-B.

AGRADECIMIENTOS

Hoy y siempre, gracias Dios. Padre mío gracias por la vida, el amor, la alegría, la salud, por todas las personas que amo y todas las bendiciones que en cada momento de mi vida me has dado. Nunca he estado sola, Tú siempre has estado conmigo.

Gracias a mi Mami y a mi Papi por darme la fortaleza y la determinación para por fin concluir una etapa tan importante. Este logro es más suyo que mío, lo reconozco y se los dedico únicamente a ustedes. No tengo palabras para agradecer todo el esfuerzo puesto en mí para ser una mejor persona. Los amo por esto y por muchísimas cosas más.

A mi hermana Fabi, siempre estaré ahí para ti. Eres una parte tan importante en mi vida sólo quiero que te des cuenta.

A Juan Carlos, corazón eres lo mas inocente y tierno que tengo en la vida. Espero que un día pueda ser tú inspiración y un ejemplo para ti.

A Víctor. Amor, tú eres la luz de mi vida. No necesito de nada más, tú iluminas mi vida en todo momento. Te agradezco todo el amor, la paciencia y la dedicación que siempre tienes para mi. Eres maravilloso y le agradezco a Dios poder estar contigo y tenerte en mi vida y en mi corazón.

A Casandra, mi bichita hermosa. La inspiración para ser Médica Veterinaria nació con ella.

Muy en especial a Mayté Hernández, es curioso como la vida de las dos se alineó de forma tan similar, gracias a ti en muchos aspectos no me siento sola. Eres un apoyo incondicional y una inspiración para mí.

A las personas que han estado conmigo y que se adelantaron en el camino: Ricardo y Yunuen q.e.p.d.

A mi asesor y responsable del programa de Servicio Social Titulación, MVZ Rafael Pérez González. Gracias por todos tus consejos y apoyo. Gracias por motivarme y presionarme para la culminación de este trabajo.

Un especial agradecimiento a mi asesora la Dra. Camila Arriaga Díaz, por todo su tiempo y apoyo dedicado en esta investigación.

A la Dra. Ana Laura Pereira Suárez y al Dr. Ciro Estrada Chávez, gracias por su apoyo y todas sus atenciones durante la realización de las pruebas en el CICYTA de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo.

Muy en especial a Cecy Romero, al Dr. Fernando Diosdado, al Dr. Dante González, a Marthita Torres y al Dr. Fernando Díaz. Gracias por su ayuda y apoyo, por su compañía y las mañanas con cafecito, hicieron de mi estancia en el INIFAP un periodo muy agradable.

A mis sinodales: MVZ. Marco Antonio Fajardo Román, M. A. Antonio Gómez Alcántara, QFB. Juana A. Alquicira Camacho y MVZ Graciela Castañeda, muchas gracias por su atención y su tiempo para la revisión de este trabajo.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Definición y etiología	2
1.2 Importancia en la salud pública y económica	3
1.3 Patogenia	4
1.4 Inmunopatogenia	5
1.5 Diagnóstico	6
1.5.1 Intradermorreacción (Prueba de Tuberculina)	7
1.5.2 Interferón Gamma (INF- γ)	7
1.5.3 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	7
1.5.4 Pruebas moleculares	8
1.5.4.1 Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	8
1.5.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos específicos	11
2.3 Objetivos académicos	11
2.4 Objetivos sociales	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1 Animales y lugar de estudio	13
3.2 Sacrificio y toma de muestras	13
3.3 Extracción de RNA total	14
3.3.1. Metodología	15
3.3.2. Ultrapurificación del RNA (Método de la DNAsa)	16
3.3.3. Precauciones para evitar la contaminación	16
3.3.4. Preparación del material para la extracción de RNA	17
3.3.5. Precauciones	18
3.4 Cuantificación del RNA	18
3.5 Electroforesis del RNA	19
3.6 RT-PCR	20
4. RESULTADOS	22
4.1 Banco de muestras	22
4.2 Cuantificación	23
4.3 Electroforesis del RNA	25
4.4 Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR)	27
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	30
7. ANEXOS	31
7.1 Anexo 1. Reactivos utilizados en la extracción de RNA	31
7.2 Anexo 2. Reactivos utilizados en la electroforesis	32
7.3 Anexo 3. Valores obtenidos en la cuantificación	33
7.4 Anexo 4 Concentración de RNA	33
7.5 Anexo 5. Mezcla para la reacción de RT y de PCR	34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35
ABREVIATURAS	40

ABREVIATURAS

BAL	Lavado Bronquio-alveolar
BE	Bromuro de Etidio
CANETB	Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbanoto
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EILISA	Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas
ID	Intradermoreacción
IL	Interleucinas
INF- γ	Interferón gama
m	Mediastínico
MA	Macrófagos alveolares
NK	Células Asesinas Naturales
NL	Nódulos linfáticos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD	Derivado Proteico Purificado
rf	Retrofaríngeo
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
tb	Traqueo-bronquial
Tb	Tuberculosis bovina
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa

RESUMEN.

La Tuberculosis Bovina (TB) es una enfermedad que causa graves problemas en Salud Pública y a nivel económico y productivo. En México no se ha podido erradicar debido a que la prueba oficial de diagnóstico, la intradermoreacción, no es muy eficiente y da falsos positivos. Así que, no existen los medios para detectar y eliminar de manera eficiente a todos los animales positivos e infectados.

Para controlar la infección se necesita entender la respuesta inmune relacionada con la resistencia en algunos animales. Esta respuesta está dada por citocinas que secretan los linfocitos y los macrófagos. Una manera de medir la expresión de estas citocinas es la prueba de la Transcriptasa Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Por medio de la técnica de Trizol se extrajo el ácido ribonucleico (RNA) de nódulos linfáticos (NL) de bovinos infectados experimentalmente con *Mycobacterium bovis* para después probar y estandarizar la técnica de Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). La técnica se estandarizó al comprobar, en geles de agarosa al 1%, la amplificación del fragmento β -Actina de un peso molecular de 890 pb. En el que se amplificó el RNA extraído de NL mediastínicos, traqueo-bronquiales y retrofaríngeos (2 μ g).

La estandarización de esta técnica servirá para futuras investigaciones en las que se necesite medir la expresión de citosina e interleucinas.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Definición y etiología.

La Tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, crónica, de distribución mundial, ocasionada por el género *Mycobacterium*, que viene de las raíces griegas *Myces*, hongo y *Bacterion* bacilo corto. Tiene un amplio rango de huéspedes, afecta a todos los animales de sangre caliente, incluido el humano. Se caracteriza por lesiones granulomatosas (Rosenberger, 1983).

La Tuberculosis Bovina (TB) continúa siendo un riesgo significativo en salud animal (Adwell et al., 1997; Cervantes, 1993). Es causada por el género *bovis* es un patógeno obligado, su presencia en un animal define su estado de infección. La detección y eliminación de animales y poblaciones infectadas es vital para el control y la erradicación de la tuberculosis bovina (Adams, 2001).

Las micobacterias son bacilos intracelulares, aerobios facultativos, inmóviles, delgados, ácido alcohol resistentes, Gram. (+) de lento y de rápido crecimiento (Sut et al., 1990; Ashford et al., 2001).

En la Tabla 1 se muestran algunas especies pertenecientes a ambos tipos de crecimiento.

Son patógenos para el humano y los animales. El género *Mycobacterium*, incluye organismos inocuos que habitan en el agua hasta agentes de enfermedades tan devastadoras como la lepra y la tuberculosis (Avaniss-Aghajani et al., 1996; Bernard, 1987; Ashford et al., 2001).

RAPIDO CRECIMIENTO		LENTO CRECIMIENTO	
<i>M. chelonae</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. senegalense</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. genavense</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. interjectum</i>
<i>M. neoaurum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. intermedium</i>
<i>M. thermoresistible</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. flavescens</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. fallas</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. marinum</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. cookii</i>

Tabla 1. Clasificación de diferentes especies del género *Mycobacterium* de acuerdo a su velocidad de crecimiento.

1.2. Importancia en la salud pública y económica.

La tuberculosis en humanos es un problema importante de salud en todo el mundo, causa un aproximado de 3 millones de muertes al año y los casos de enfermedad activa aumentaron a ocho millones (Weedlock et al., 1999; Dye et al., 1999). *Mycobacterium bovis*, contribuye a los casos en una proporción indeterminada, debido a la falta de tipificación para diferenciar entre especies.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ha creado una población particularmente susceptible a la infección por el género *Mycobacterium*. Especies como *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. bovis* son conocidas como patógenos, ahora otras especies como *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii*, están atacando como patógenos oportunistas. En la Tabla 2 se observan diferentes especies de *Mycobacterium* y los animales a los que afecta comúnmente. *M. bovis* en particular tiene un margen de hospedadores bastante extenso (Ashford et al., 2001; Rastogi et al., 2001; Carter, 1994; Bernard, 1987).

Especies del género <i>Mycobacterium</i>	Animales que afectan
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Pollos, pájaros y cerdos Paloma torcaz y ciervo Bovinos, ovinos, caprinos y rumiantes silvestres
<i>M. bovis</i>	Bovinos, borregos, perros, gatos, monos, simios, mink, cerdos, elefantes, rinocerontes, pericos, venados, zorros, tapires, camellos, bisontes, llamas, humanos
<i>M. tuberculosis</i>	Bovinos, monos, simios, cerdos, perros, caballos, tapires, elefantes, humanos
<i>M. lepraemurium</i>	Gatos, ratas, ratones
<i>M. fortuitum</i>	Perros, vacas, cerdos, anfibios, primates, cerdos
<i>M. marinum</i>	Peces, moluscos y sapos
<i>M. kansasii</i>	Monos, vacas y cerdos
<i>M. chelonae</i>	Cerdos, peces, reptiles, manatíes y primates
<i>M. leprae</i> .	Armadillo y humanos

Tabla 2. Diferentes especies del género *Mycobacterium* y sus principales hospedadores

La tuberculosis en animales de producción es un problema económico en los países en desarrollo, debido al sacrificio y decomiso de animales infectados (Aldwell et al., 1997; Wedlock et al., 1999; Nozaki et al., 1997).

En México, en los años 70's, surge la Campaña Nacional para la erradicación de la Tuberculosis Bovina (CANETB) en respuesta a las demandas sanitarias de importación de EUA. Se enfatizó en el control en el norte del país. La prevalencia de TB se ha estimado en 2.1% para el ganado lechero y en 0.1% para el ganado de carne y una morbilidad entre 11 y 15%. Se ha logrado reducir la prevalencia de TB en el norte del país, considerándose ya 4 estados en etapa de erradicación (CANETB, 1997).

1.3. Patogenia.

Los bacilos salen al exterior en el aire espirado, durante la tos, los estornudos y los esputos de los animales clínicamente enfermos. La infección se da por la inhalación de aerosoles y la ingestión de leche o sus derivados, aunque la principal vía de transmisión de la TB, es la aerógena. La ingestión de leche contaminada puede ser una fuente de infección para los animales lactantes y para el hombre (Radostits et al., 2002; Goodchild et al., 2001).

La infección primaria de la tuberculosis pulmonar comienza después de la inhalación del bacilo dentro de los alvéolos pulmonares, en donde los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares (MA), se multiplican dentro de los macrófagos e inducen la formación de una lesión primaria (Barrow, 2001; Felton et al., 1996).

El desarrollo de la enfermedad depende de la habilidad de las micobacterias para establecer la infección: sobrevivir la fagocitosis de los macrófagos, crecer dentro de las células, provocar su muerte y atraer a otras células de defensa (quimiotaxis). Así, poder formar el granuloma, que es la lesión característica, formada por un centro necrótico con bacterias libres, rodeado de macrófagos, envuelto a su vez, por tejido conectivo fibroso (Ashford et al., 2001; Aldwell et al., 1997; Rastrogi et al., 2001).

La diseminación es secundaria, produce nuevos focos de infección y puede adoptar la forma de tuberculosis miliar aguda, de lesiones nodulares aisladas en diversos órganos o de tuberculosis crónica. Es causada por la reinfección endógena. Cuando el granuloma se ablanda o se licua, las micobacterias invaden los bronquios y llegan a partes sanas del pulmón. También pueden ser transportadas hacia otros nódulos linfáticos a través de los vasos linfáticos durante el curso de la enfermedad (Radostits et al., 2002; Estrada, 1995).

De manera habitual, la enfermedad aparece años después de la infección inicial, debido a reinfecciones exógenas o endógenas inducidas por una inmunosupresión o a susceptibilidad genética intrínseca o a ambas (Kaufmann, 2001; Radostits et al., 2002).

1.4. Inmunopatogenia.

En la infección primaria los macrófagos no son capaces de eliminar a las micobacterias fagocitadas. Hay factores que permiten esta supervivencia como la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma o la resistencia de micobacterias a enzimas lisosomales y metabolitos activos del oxígeno (Felton et al., 1996; Cassidy et al., 1998; Tizard, 1987).

Los animales infectados generan varias respuestas (Jiménez et al., 2001; Tizard, 1987; Weldlock et al., 1999):

La eliminación, el sistema inmune responde efectivamente y mata a todos los antígenos, no se desarrolla la enfermedad y el animal adquiere cierta resistencia.

El desarrollo de la enfermedad, la micobacteria no es eliminada y empieza a multiplicarse.

Enfermedad latente, el sistema inmune impide el crecimiento del bacilo sin eliminarlo totalmente. Las micobacterias quedan latentes.

La reinfección, los antígenos latentes, vuelven a multiplicarse.

Los macrófagos son los responsables de restringir o eliminar al agente, son atraídos por citocinas pro inflamatorias como $TNF\alpha$, IL-1, IL-6 y quimiocinas

(citocinas quimiotácticas) participan en la prevención de la diseminación, inducen la migración de los leucocitos, regulan la adhesión celular, la activación y el retorno al sitio de activación inicial, también pueden dirigir a los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) a los sitios donde se está iniciando una respuesta. Todo este proceso se conoce como hipersensibilidad de tipo IV (Schlesinger et al., 1990 Tizard, 1987).

Las citocinas son producidas por células epiteliales, endoteliales y macrófagos en respuesta a factores irritantes, activadores, antígenos y otras citocinas (Parslow et al., 2002).

La IL-12 e IL-8 son citocinas producidas por los macrófagos atraídos y activados. Inducen la producción de INF- γ en las células asesinas naturales (NK) e incrementa su actividad citotóxica (Wedlock et al., 1999).

La respuesta Th2 produce grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecen la respuesta inmune contra patógenos extracelulares. Las IL-4, IL-10 e IL-13 modulan negativamente la respuesta Th1 (Parslow et al., 2002).

La respuesta inmune protectora contra la tuberculosis depende de la interacción de la inmunidad específica (respuesta Th1) e inespecífica (respuesta Th2) (Wedlock et al., 1999).

1.5. Diagnóstico.

El control y la erradicación de la TB dependen de la detección oportuna y remoción de la fuente potencial de infección, por esto es necesaria la rápida identificación y eliminación de los animales infectados. Para el control se requiere de una prueba de sensibilidad y especificidad aceptable.

La prueba ideal debe identificar correctamente animales infectados con *M. bovis* mientras descarta los animales no infectados. (Adams, 2001)

Las investigaciones se han enfocado en identificar las ventajas y desventajas de los métodos diagnósticos disponibles, particularmente de la prueba de reacción intradérmica (ID) de la tuberculina, actualmente utilizada por la CANETB. Los falsos positivos, animales no reactivos (anérgicos) con infecciones recientes e

infecciones severas, generalizadas. Los animales infectados no detectados permanecen como fuente de contaminación y pueden ser la causa de la reaparición o el incremento de reactores en hatos ya controlados. Por esto, se ha tratado de desarrollar métodos de diagnóstico alternos que permitan detectar animales que puedan estar diseminando la tuberculosis. (Radostits et al., 2002)

1.5.1. Intradermorreacción (Prueba de Tuberculina).

Es una prueba basada en la inmunidad celular. Mide la hipersensibilidad de tipo tardío y es actualmente usada por la CANETB, se realiza inoculando intradérmicamente un derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis*, para medir la inflamación de la piel en el sitio de aplicación a las 72 horas posteriores (Wagner et al., 1999; Rhodes et al., 2000; Vondermeier et al., 2003).

1.5.2. Interferón Gamma (INF- γ).

Esta es una prueba de diagnóstico alternativo para la TB, detecta la producción de interferón gamma *in vitro*, evalúa la inmunidad celular por medio de la detección de INF- γ producido por los linfocitos T previamente sensibilizados con antígenos específicos de *M. bovis* se utiliza sangre completa heparinizada y PPD-bovino como antígeno específico (Rothel et al., 1990; Prince et al., 2003).

Se estima que la prueba de INF- γ posee una sensibilidad de entre el 70 y 94% con una especificidad que varía entre un 97 y 99%. (Díaz et al., 2003)

1.5.3. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

Esta técnica se emplea para la detección de anticuerpos, por medio del uso de antígenos específicos de micobacterias, simultáneamente usa anticuerpos ligados a una enzima. Esta prueba mide la respuesta hacia *M. bovis*, se pueden detectar animales negativos a la tuberculina pero con lesiones a la necropsia (anérgicos). Tiene algunos inconvenientes, la respuesta inmune esta dirigida hacia

los antígenos no específicos, ha mostrado una baja producción de anticuerpos, la respuesta inmune es principalmente celular excepto en individuos que presenten cuadro clínico o se encuentren en estados avanzados de la enfermedad (O'Reilly, 1995).

1.5.4. Pruebas moleculares.

Las pruebas de diagnóstico se han enriquecido con el desarrollo de la biología molecular. Los métodos basados en la amplificación del DNA de las micobacterias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la identificación de secuencias de ácido desoxiribonucleico (DNA) específicas dentro del genoma de *Mycobacterium spp.*, las técnicas de purificación de DNA y el establecimiento de mapas de restricción, permiten identificar a distintas especies de este género bacteriano (Adams et al., 1992; Erlich, 1992).

Es posible la identificación de *M. bovis*, sin requerir del aislamiento previo, prácticamente a partir de cualquier muestra biológica. La PCR y otros métodos moleculares han sido utilizadas para la detección de micobacterias en muestras clínicas tanto en humanos como en bovinos y se consideran pruebas sensibles y específicas.

Muchos de estos procedimientos son adaptables a los laboratorios modernos y son herramientas útiles para el avance en el conocimiento de las dinámicas en la transmisión de *M. bovis* entre los animales. Su amplio margen para detectar y diferenciar *Mycobacterium spp.* está ampliamente documentado. Aun no están del todo estandarizadas, la mayoría son laboriosas y requieren un adiestramiento técnico (Adams, 2001; Ausubel et al., 1999).

1.5.4.1. Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

La amplificación del RT-PCR se realiza mediante un proceso de dos etapas. En la primera etapa se utiliza una enzima llamada transcriptasa reversa (RT) que

sintetiza una cadena de DNA complementaria al RNA de interés (cDNA). En la segunda etapa se utiliza este cDNA como material de inicio para la amplificación mediante la PCR utilizando una DNA polimerasa termoestable (Jones et al., 1994; Adams et al., 1992).

Mientras que la PCR convencional revela la presencia y estructura de una secuencia de gen particular, la RT-PCR indica en que medida se ha expresado el gen de interés. En la Figura 1 se esquematiza la reacción de la síntesis del cDNA.

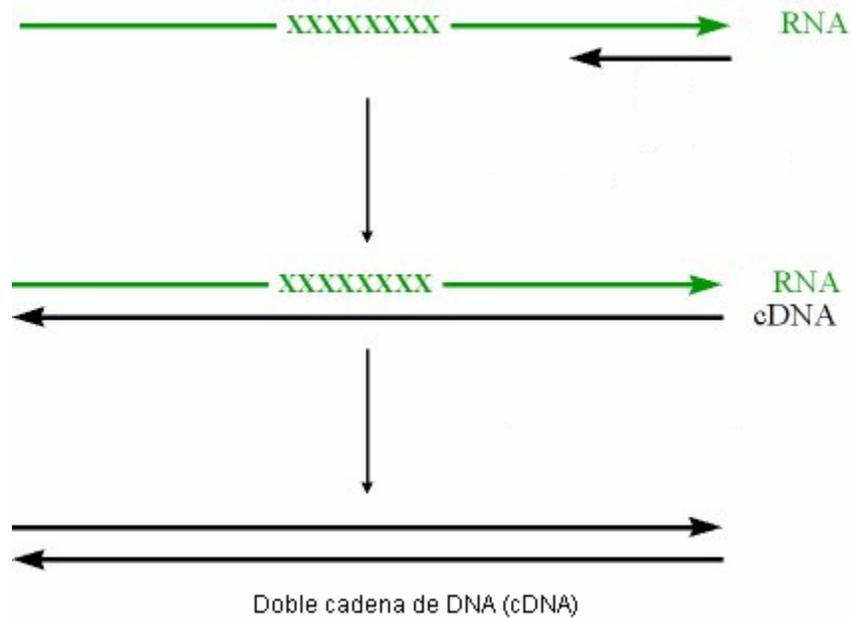


Figura 1. La Reacción de Transcripción Inversa

1.5.4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), amplifica el material genético (DNA) para su análisis. Se reportó por primera vez en 1971. Esta reacción tiene su fundamento en copiar las dos cadenas del DNA blanco por medio de una DNA polimerasa (Taq polimerasa), originalmente aislada de una bacteria termofílica *Thermus aquaticus*

que sobrevive las temperaturas necesarias para la desnaturalización del DNA (Jones et al., 1994; Aoyagi, 2001).

Es una técnica enzimática que replica de modo exponencial secuencias específicas de DNA *in vitro*, así es posible analizar muestras muy pequeñas que contienen inicialmente menos de diez copias de las secuencias de interés. Aprovecha las propiedades químicas de los ácidos nucleicos y de enzimas muy especializadas que pueden reparar y replicar selectivamente una región en particular del DNA blanco *in vitro* (Walker, 1988; Erlich, 1992; Bordon, 1978).

Mediante ciclos repetidos de desnaturalización, fijación y síntesis, la región entre los dos iniciadores se amplifica exponencialmente y el número de copias de doble cadena en esta región se duplica en cada ciclo. El proceso del ciclo de amplificación se realiza en instrumentos automáticos programables que pueden acomodar muchas muestras y se utilizan polimerasas de DNA bacteriano (Adams et al., 1992; Ausubel et al., 1999). En la Figura 2 se esquematiza la reacción de PCR.

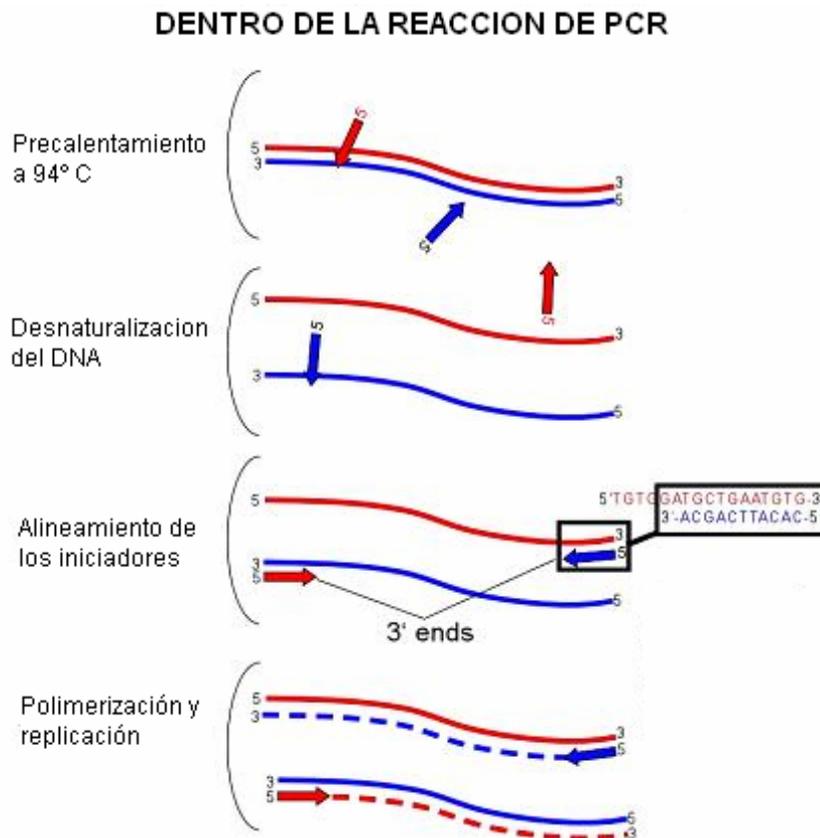


Figura 2. La Reacción en Cadena de la Polimerasa.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

- Estandarizar la prueba de RT-PCR demostrando la amplificación del gen β -Actina, utilizando un oligonucleótido, mediante la extracción de RNA a partir de muestras de animales desafiados con *M. bovis*.

2.2. Objetivos específicos.

- Obtener un banco de muestras de animales desafiados con *M. bovis* extraer el RNA, purificarlos con DNasa y probar su integridad en geles de agarosa.
- Capacitarme en la técnica de Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).
- Demostrar por medio de la técnica de RT-PCR que los RNA extraídos amplifican el gen β -Actina en los distintos órganos.

2.3. Objetivos académicos.

- Conocer y aplicar nuevas técnicas de laboratorio para detectar la expresión de genes que puedan contribuir, en posteriores investigaciones, para el control de enfermedades como la tuberculosis bovina (TB).
- Poner en práctica los conocimientos adquiridos durante la licenciatura en las asignaturas de Zootecnia de bovinos productores de leche, Inmunología y Fisiología Veterinaria.

2.4. Objetivos sociales.

- Capacitar personal dedicado a la investigación científica, dado que es un área de la Medicina Veterinaria que no se desarrolla a menudo.
- Utilización de métodos inmunológicos y moleculares para un diagnóstico mas eficiente de la tuberculosis bovina y un mejor entendimiento de la forma como se difunde la enfermedad en los bovinos, que nos permita establecer medidas de control eficaces que ayuden a prevenir su difusión y transmisión al humano.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Animales y lugar de estudio.

Se utilizaron veinticuatro bovinos hembras Holstein-Friesian, entre los ocho y dieciséis meses de edad procedentes del Estado de Guanajuato, obtenidos de hatos certificados libres de tuberculosis bovina. Se confirmó su estado libre de la enfermedad con pruebas de tuberculina, interferón gama (IFN- γ), inmunoensayo (ELISA) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Todos los animales de estudio fueron negativos a todas las pruebas.

Se alojaron dentro de las instalaciones del CENID-Microbiología INIFAP, donde estuvieron en adaptación un periodo de 3 semanas, en la primera semana recibieron tratamiento de antibióticos y vitaminas, también se vacunaron contra Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (Pb), Diarrea Viral Bovina (DVB) y Enfermedad Respiratoria Sincitial (VRSB).

3.2. Sacrificio y toma de muestras.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo de manera humanitaria.

Se recolectaron las siguientes muestras de tejidos.

- Sangre completa con (heparina), suero, plasma (EDTA).
- Líquido de lavados bronquio-alveolares (BAL).
- Pulmones (inserción apical del lóbulo craneal derecho)
- Glándula mamaria
- Nódulos linfáticos (NL): retrofaríngeos (rf), traqueobronquiales (tb), mediastínico (m).
- Bazo.
- Hígado.
- Glándulas adrenales.
- Parótida
- Timo.
- Corazón.
- Riñón.

Las muestras se recolectaron en porciones de aproximadamente 2 – 3 cm Se almacenaron en sobres de aluminio esterilizados por calor seco. Se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. Se cortaron pequeños cubos de alrededor de 0.5 cm y se almacenaron e identificaron en criotubos y se guardaron a –70°C. Pueden almacenarse a esta temperatura hasta por 6 años para futuras pruebas.

Los lavados bronquio-alveolares (BAL) se obtuvieron de pulmones recién seccionados, se introdujo por la traquea solución de Hanks y los lóbulos se masajearon por 5 a 10 minutos. El fluido se acumulo en matraces estériles y tratados para RNA, por medio de una bomba de vacío. Se llevaron en hielo y se pasaron a tubos de polipropileno.

3.3. Extracción de RNA total.

La extracción se realizó por el método de Trizol, se forman complejos de Guanidina y moléculas de agua con RNA, por lo que se eliminan las interacciones hidrofílicas con el DNA y proteínas, que son separadas en la fase acuosa donde se encuentran los complejos de RNA-guanidina.

El reactivo de TRizol™ Reagent¹ es una solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina. Durante la homogenización de la muestra o la lisis, el Trizol mantiene la integridad del RNA mientras rompe las células y disuelve los componentes celulares (Chomczynski, 1987).

La adición de cloroformo y la centrifugación separa la solución en una fase acuosa y una fase orgánica. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa. El RNA se recupera de la fase acuosa por precipitación con isopropanol.

El tiempo de realización del método, es de aproximadamente una hora y media. Es un método sencillo, especialmente conveniente para estudios de la expresión genética cuando la cantidad de material biológico disponible es limitado.

El RNA aislado se encuentra listo para realizar diferentes pruebas como RT-PCR.

¹ Invitrogen™ Life Technologies

3.3.1. Metodología.

- Se homogenizaron sin descongelar las muestras tisulares en 1 ml de TRIzol™ Reagent¹ en un tubo de polipropileno, usando un Power homogenizer (Poli-trón). El volumen de muestra no debe exceder el 10% del volumen de reactivo de Trizol usado para la homogenización. En este punto se puede volver a congelar a -70°C si no se puede continuar de inmediato.
- Se incuban las muestras homogenizadas a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteína.
- Se agregan 200 μl de Cloroformo por cada 1000 μl de Trizol.
- Se tapan los tubos, se agitan 15 seg. Las muestras se pueden almacenar a -70°C por lo menos un mes.
- Se transfiere la mezcla y se incuba la suspensión 5 min a 4°C .
- Se centrifuga la suspensión a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C , en una microcentrifuga (BECKMAN Microfuge 12).
- Después de la centrifugación las muestras se separan dentro del tubo en una fase inferior rosa que contiene DNA y proteínas, una interfase blanca y una fase acuosa superior e incolora, el RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa.
- Se transfiere la fase acuosa a otro tubo limpio.
- Se precipita el RNA de esta fase acuosa mezclándolo con isopropanol, 500 μl por cada 1000 μl de Trizol usado para la homogenización.
- Se incuba durante 15 min a 4°C . Después las muestras pueden dejarse toda la noche a -20°C si se requiere interrumpir la extracción.
- Se centrifuga a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C . El precipitado de RNA forma un pellet gelatinoso en el fondo del tubo.
- Se elimina el sobrenadante, teniendo cuidado de no desprender el pellet.
- Se lava el pellet con 800 μl de etanol al 75% enfriado a -20°C y se agita. El precipitado de RNA puede almacenarse en etanol al 75% a 4°C por lo menos una semana o al menos un año a -20°C .
- Se centrifuga a 12 000 rpm durante 10-15 min. a 4°C y se elimina el

sobrenadante. Se seca el pellet de RNA, no completamente por que esto reduciría su solubilidad.

- Se resuspende el botón pasando a través de la punta de una pipeta agua destilada y desionizada tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC).
- Para conservarlo y una vez disuelto completamente se agregan en el siguiente orden: 500 µl de etanol al 100% previamente enfriado a -20°C y 70 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.3. Se mezcla y se guarda a -70°C, ya que así puede durar años.

Los reactivos y su preparación se encuentran con detalle en el Anexo 1.

3.3.2. Ultrapurificación del RNA (Método de la DNAsa).

- Se aísla el RNA de acuerdo al método de Trizol.
- Después del lavado con etanol al 75% se agregan 190 µl de Buffer de DNAsa¹ 1X al botón de RNA y 10 µl de DNAsa¹ (1000 U/ml).
- Se mezcla y se incuba en baño maría a 37°C durante 15 min.
- Se agregan 200 µl de Fenol¹ saturado a cada muestra (vol/vol), se agita 15 seg y se centrifuga 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente.
- Se transfiere la fase superior (incolora).
- Se adicionan 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (vol/vol), se agita 15 seg y se centrifuga 2 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Se transfiere la fase superior.
- Se agregan 500 µl de etanol al 100% y 70 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.3. Se agita y se guarda a -70°C.

3.3.3. Precauciones para evitar la contaminación.

La enzima RNasa puede introducirse accidentalmente a la preparación del RNA por un manejo inadecuado, en cualquier punto del aislamiento. Debido a que la actividad de la RNasa es difícil de inhibir, es esencial evitar su introducción, por lo que se recomienda:

¹ Invitrogen. Life Technologies

- Usar siempre guantes desechables libres de polvo. La piel frecuentemente contiene bacterias y mohos que pueden contaminar una precipitación de RNA y ser una fuente de RNAsa.
- Usar material estéril, desechable y pipetas automáticas reservadas para el trabajo con RNA para evitar contaminación cruzada con RNAsa del equipo común.

En presencia de Trizol, el RNA está protegido de la contaminación de RNAsa.

3.3.4. Preparación del material para la extracción de RNA.

- Material de vidrio:

Se llena cada uno de los frascos y matraces con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 4 N y se dejan un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente.

Se enjuagan con agua destilada y desionizada.

Se tapa y se hornea a 200°C durante 4 horas o a 180°C durante 6 horas.

- Material plástico:

Se sumergen todos los tapones de baquelita en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N y se dejan un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente.

Se enjuagan con agua destilada y desionizada.

- Material de metal:

Se lava con agua destilada. Se envuelve y se hornea a 200°C durante 4 horas ó 180°C durante 6 horas.

El material sucio reutilizable se recolecta aparte de cualquier otro material. No se lava con detergentes, solo se enjuaga perfectamente con agua destilada desionizada, se tapa o envuelve en papel aluminio y se hornea, si es necesario se trata nuevamente con HCl.

3.3.5. Precauciones.

- Los solventes (cloroformo) y los alcoholes (isopropanol) se conservan en botellas de vidrio, nunca de plástico.
- Los reactivos que se pesan (sales) deben ser de uso exclusivo para RNA (grado: Biología Molecular) y solo deben emplearse espátulas horneadas.
- Para medir el pH de las soluciones se prefiere emplear papel tornasol en vez de un potenciómetro comunitario.
- Todas las soluciones para RNA se preparan con agua destilada desionizada-DEPC excepto las que llevan Tris ya que éstas se preparan con agua destilada desionizada esterilizada en autoclave.
- Se mantienen las enzimas en hielo o en cámaras frías (Stratagene) cuando se encuentren fuera del congelador (-20°C).
- No se recomiendan congeladores que no hacen escarcha debido a las variaciones en la temperatura.
- No se reutilizan los guantes.
- Se usa el DEPC en presentaciones de 5 ml, puede ser explosivo, se almacena concentrado y una vez abierto se debe preparar todo.
- Cuando se trabaja con Trizol se requiere usar bata, guantes y gafas protectoras. Evitar el contacto con la piel o la ropa. Evitar aspirar los vapores. Úsese en una campana de extracción de gases.

3.4. Cuantificación del RNA.

La cuantificación del RNA se realizó en un espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia Biotech). Las muestras se ajustaron a 100 ng/μl por medio de diluciones con agua bidestilada para facilitar su uso.

Para conocer la pureza del RNA se hace una lectura a 260 y 280 nm. La relación de los valores de las lecturas 260/280 es de 1.6 para RNA puro (Martin et al., 2001; Jones et al., 1994).

Para conocer la concentración de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se realiza la lectura de 260 nm, la lectura obtenida se multiplica por 40 para RNA o DNA de cadena sencilla y el resultado obtenido se expresa en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se ajusta la concentración final de todas las muestras para colocar 2 μg en la reacción de RT y 4 μg en el gel de agarosa.

3.5. Electroforesis del RNA.

- Se prepara la agarosa al 1% en buffer de corrida (TBE).
- Se vacía la solución en un vidrio o en un molde para electroforesis horizontal, es mejor si el gel es delgado de 1.5 a 2 mm.
- Se insertan los peines para formar los pozos en donde se colocarán las muestras y se deja enfriar hasta que solidifique.
- Opcional: Se funde la agarosa en 30 ml de agua DEPC, se adicionan 10 ml de buffer de corrimiento 5X y 9 ml de formaldehído al 37%.
- Se colocan 4 μg de RNA, 2 a 4 μl de buffer de carga, 1 μl de bromuro de etidio (BE) y se carga en un gel.
- Se llena la cámara de electroforesis con Buffer de corrida 1X (TBE) y se sumerge el gel dentro del buffer.
- Se coloca el marcador de peso molecular en el primer pozo y las muestras en los siguientes pozos del gel.
- La migración de las moléculas es del polo negativo al positivo.
- Se corre a 100 Volts por 20 minutos aproximadamente.
- Los fragmentos de RNA separados pueden ser visualizados con un transiluminador.

Las moléculas de BE se intercalan en los nucleótidos y producen fluorescencia naranja al ser iluminada con luz ultravioleta (UV), señalando así los sitios del gel donde están los fragmentos de RNA.

Los reactivos y su preparación se encuentran con detalle en el Anexo 2.

3.6. RT-PCR.

Una vez que se cuantifica y se detecta la integridad del RNA se procede a probar la técnica de RT-PCR por medio de la amplificación del gen de β -Actina. A través de la transcriptasa reversa se sintetiza la cadena de cDNA del RNA total aislado de cada muestra.

Las reacciones de RT, se realizaron en un volumen de 10 μ l y la mezcla contenía:

2 μ l de 5x First-Strand Buffer¹ (50 mM Tris-HCL, pH 8.3, 7 mM MgCl₂, 40 mM KCl), 1 μ l de 1 mM Dithiothreitol (DTT),¹ 1 μ l 0.1 mM de mezcla de desoxiribonucleótidos, dNTP¹ (10mM de cada uno dATP, dGTP, dCTP y dTTP a un pH neutro), 1 μ l Oligo d(T)₁₂₋₁₈ Primer¹, 0.5 μ l RNaseOUT™¹ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. (40 units/ μ l), 0.5 μ l SuperScript™ II Rnase H Reverse Transcriptase¹ y 2 μ g de RNA Total.

La reacción de RT se desarrolló en un termociclador (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700), se somete a un ciclo de RT de 42°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos, después se mantiene a 4°C.

El cDNA sintetizado se agrega a la reacción de PCR que se lleva a cabo en un volumen final de 10 μ l. La mezcla contenía:

1 μ l de GeneAmp 10X PCR Gold Buffer² (150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM KCl), 0.8 μ l 25 mM MgCl₂ Solution² (25 mM MgCl₂), 1 μ l 10 mM de mezcla de desoxiribonucleótidos, dNTP¹ (10mM de cada uno dATP, dGTP, dCTP y dTTP a un pH neutro), 1 μ l de Primer β -Actina forward 5' ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG 3', 1 μ l de Primer β Actina reverse 3' GCA TTT GCG GTG GAC AAT GGA 5' (Shoda et al., 2000), 0.2 μ l AmpliTaq Gold² 5 U/ μ l, 2 μ l de la reacción de RT (cDNA), Agua DEPC cbp 10 μ l.

¹ Invitrogen. Life Technologies

² Applied Biosystems

Las reacciones de PCR se desarrollaron en un termociclador (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700) con las siguientes condiciones: precalentamiento a 94°C por 12 min seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 60°C por 1 min y extensión a 72°C 1 min, seguido de una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de amplificación se guardaron a 4°C.

4. RESULTADOS.

4.1. Banco de muestras.

Los animales se sacrificaron entre Mayo y Junio del 2005. Los tejidos se congelaron a -70°C ya que serán utilizados en varias investigaciones.

Los tejidos se llevaron en congelación al CICYTA de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo.

En la Tabla 3 se especifica cuales son las muestras que se obtuvieron de cada animal.

No. Animal	Sangre	Suero	Plasma	BA	Pulmón	N.L. rf	N.L. tb	N.L. m	Bazo	Hígado	Timo	Corazón	Riñón	G. mamaria	G. adrenal	Parótida
1	/	/	/	BA	+	/	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	BA	+	/	+	+	+	/	+	+	+	+	/	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	/	/	/	+	+	/	+	/	+	/	/	/	+	+	/	/
8	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	/	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	/	+	+	+	/	+	/	+	+	+	+	+	+	/	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. Banco de muestras realizado durante la necropsia de los animales.

+ Se obtuvo la muestra
/ No se obtuvo la muestra
BA Broncoaspiró

4.2. Cuantificación.

Los ácidos nucleicos tienen una absorbancia máxima de luz en la región ultravioleta a 260 nanómetros (nm). Esto se usa para determinar su concentración en una solución y el grado de contaminación con proteínas que tienen una absorbancia máxima a 280 nm.

Hay que recordar que la relación de los valores de las lecturas 260/280 (rango) es de 1.6 para RNA puro. Si se obtienen valores mayores a 1.8 el RNA pudiera estar contaminado con proteínas o DNA; menores a 1.4 quiere decir que el RNA esta muy sucio o degradado.

En la Tabla 4 se muestra el rango de los diferentes nódulos linfáticos. Las mediciones obtenidas en la cuantificación para la densidad de 260 nm y 280 nm se refieren en el Anexo 3.

Rango = 260/280

MUESTRA	RANGO
NL m 2	1.5
NL m 3	1.6
NL m 6	1.5
NL m 9	1.6
NL m 10	1.5
NL m 11	1.7
NL m 14	1.5
NL m 21 a	1.5
NL m 21 b	→ 0.2
NL m 24	1.6
NL tb 10	1.5
NL tb 11 a	→ 3.7
NL tb 11 b	1.5
NL tb 17	1.5
NL tb 21	1.5
NL tb 23	1.4
NL rf 8	→ 1.2
NL rf 12	1.7
NL rf 14	1.6
NL rf 16	1.6
NL rf 24	1.5

Tabla 4. Valores de integridad del RNA.

De las 21 muestras analizadas se obtuvieron rangos entre 1.4 y 1.8 en 18 muestras y solo en tres muestras se obtuvieron rangos de 0.2, 1.2 y 3.7, por lo que se puede afirmar que el RNA extraído conserva su integridad.

Después de analizar y comprobar la integridad del RNA se mide su concentración por medio de una relación con un factor establecido para RNA y se expresa en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En la Tabla 5 se hace referencia a la concentración obtenida del RNA de las diferentes muestras.

Factor de dilución = $\text{vol H}_2\text{O} / \text{vol muestra}$

Concentración = $260 \times 40 \times \text{Factor de dilución } \mu\text{g}/\mu\text{l}$

MUESTRA	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
NL m 2	2.74
NL m 3	4.23
NL m 6	3.31
NL m 9	3.82
NL m 10	3.22
NL m 11	9.62
NL m 14	4.00
NL m 21 a	3.49
NL m 21 b	0.03
NL m 24	6.84
NL tb 10	3.40
NL tb 11 a	0.52
NL tb 11 b	1.16
NL tb 17	4.00
NL tb 21	4.65
NL tb 23	3.69
NL rf 8	1.39
NL rf 12	2.01
NL rf 14	7.09
NL rf 16	5.07
NL rf 24	3.62

Tabla 5. Concentración del RNA extraído.

La concentración en μl de RNA que se colocó en el gel de agarosa ($4 \mu\text{g}$) y en la reacción de RT ($2 \mu\text{g}$) se refieren en el Anexo 4

4.3. Electroforesis del RNA.

Los ácidos nucleicos pueden ser analizados por electroforesis en un gel de agarosa, debido a que cuando están en una solución a pH neutro, los grupos fosfato les confieren una carga neta negativa. Esta carga eléctrica hace que cuando se ponen moléculas de DNA o RNA en un campo eléctrico estas tiendan a moverse en dirección al polo negativo del campo. Si las moléculas en movimiento por el campo eléctrico se ponen en una matriz gelificada, las moléculas más pequeñas pueden moverse más rápido que las más grandes y esto nos permite separar fragmentos de diferente tamaño (Booz, 2001).

Para observar la integridad del RNA antes de realizar la técnica de RT-PCR se realizó la electroforesis del RNA con un gel de agarosa al 1% se cargó 4 μg de RNA, 1 μl de Bromuro de etidio y 4 μl de buffer de carga en cada carril.

En las Figuras 3, 4 y 5 se observa la integridad del RNA de Nódulos Linfáticos de bovinos infectados experimentalmente.

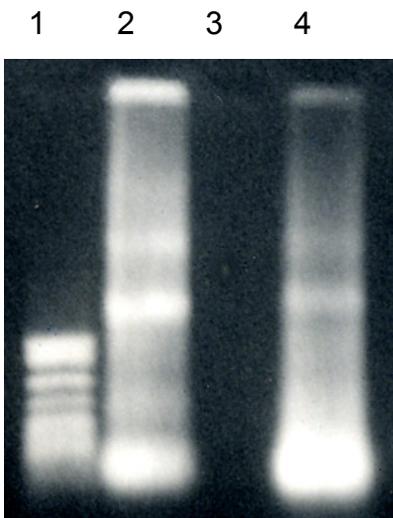


Figura 3. Carril 1, Marcador de peso molecular (pb). Carriles 2 y 4, RNA extraído de Nódulos Linfáticos. Carril 3, Vacío.

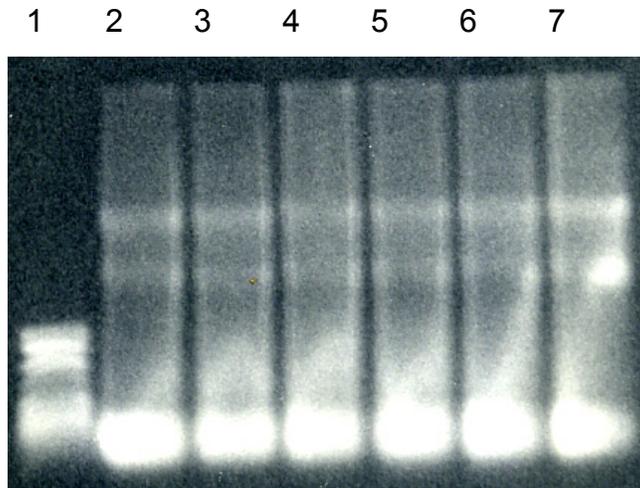


Figura 4. Carril 1, Marcador de peso molecular (pb). Carriles 2 al 7, RNA extraído de Nódulos Linfáticos.

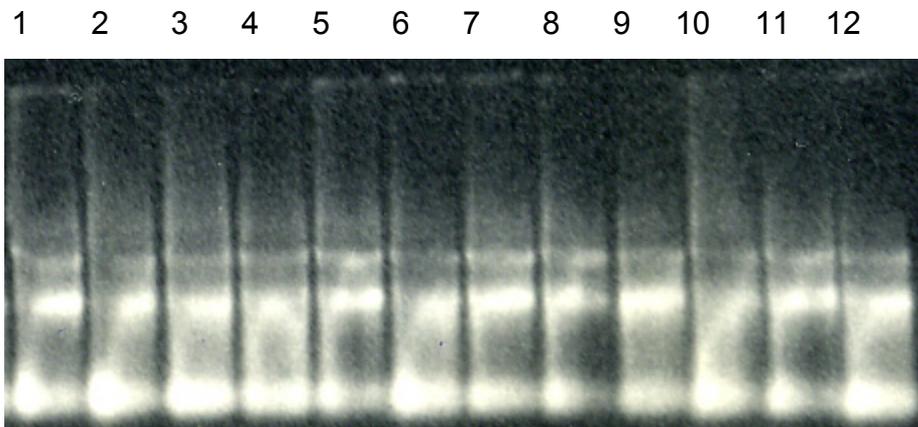


Figura 5. Carriles 1 al 12, RNA extraído de Nódulos Linfáticos.

Con la realización de estos geles podemos observar la integridad del RNA por la presencia de las dos bandas superiores que marcan dos subunidades. La banda que se observa al final del gel nos indica que hay un poco de RNA degradado, pero con la cantidad íntegra obtenida nos es suficiente para la realización del RT-PCR. En las figuras 3 y 4 se observa el RNA sin la ultrapurificación con DNasa con la presencia de DNA en forma del barrido en la parte superior del gel. En la figura 5 se observa el RNA más limpio después de la ultrapurificación con DNasa, ya no se observa el barrido y se obtiene un RNA íntegro y libre de DNA.

4.4. Electroforesis de los productos de amplificación (RT-PCR).

Los productos de amplificación de β -Actina (890pb) se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta en un foto-documentador (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioluminescence Systems). La mezcla para el RT y el PCR se realizó a un volumen final de 10 μ l. Las concentraciones final se encuentran detalladas en el Anexo 5.

En las Figuras 6, 7 y 8 se muestran los resultados de la RT-PCR utilizando Nódulos Linfáticos de animales infectados experimentalmente con *M. bovis*.

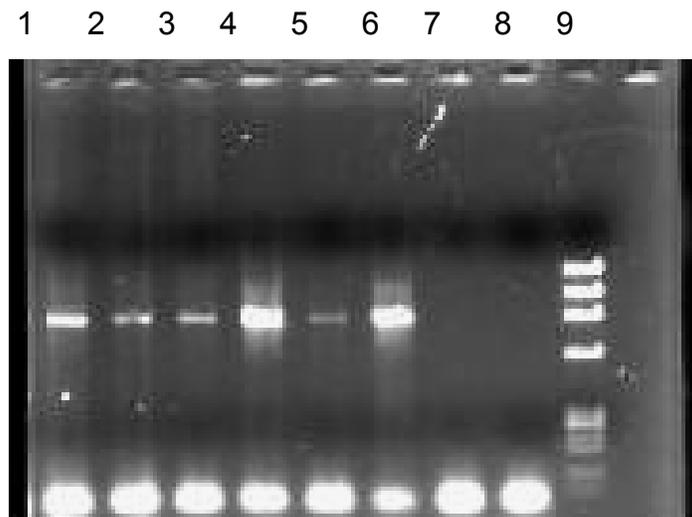


Figura 6. Carriles 1 a 6, productos de amplificación obtenidos con muestras de Nódulos Linfáticos. Carriles 7 y 8, controles negativos (H₂O). Carril 9, marcador de peso molecular (pb).

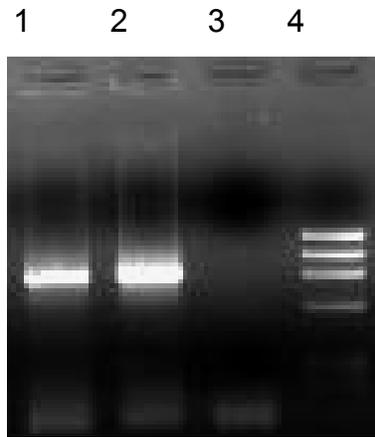


Figura 7. Carriles 1 y 2, productos de amplificación obtenidos con muestras de Nódulos Linfáticos. Carril 3, control negativo (H_2O). Carril 4, marcador de peso molecular (pb).

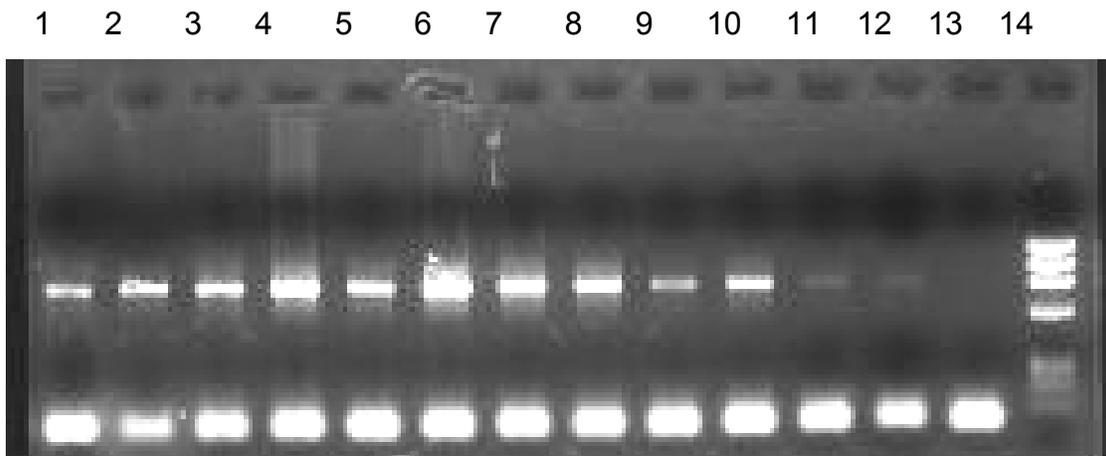


Figura 8. Carriles 1 al 12, productos de amplificación obtenidos con muestras de Nódulos Linfáticos. Carril 13, control negativo (H_2O). Carril 14, marcador de peso molecular (pb).

5. DISCUSIÓN.

La tecnología moderna y la biología molecular han afectado las pruebas diagnósticas de la tuberculosis, las de detección, las confirmatorias y las de exclusión. Representando una mejor calidad en las pruebas o un mejor conocimiento de la interacción de *M. bovis* con el huésped (Adams, 2001).

Se ha demostrado la interacción entre linfocitos T y macrófagos para el control de la infección. Las citocinas específicas que regulan la resistencia inmunológica son predominantemente las Th1, Interferón gama (INF- γ) e Interleucina-2 (IL-2) (Barnes et al., 1993).

Las técnicas moleculares como la RT-PCR se han usado en numerosos estudios para determinar la expresión de citocinas (IL-10, IL-12, INF- γ , TNF- α) que regulan la respuesta a la infección, no solo contra *M. bovis*, sino también contra otros patógenos como *Babesia bovis*, *Tripanosoma congolense* y *T. Vivax*.

La amplificación del β -Actina comprueba que los reactivos son funcionales con las concentraciones usadas (Aldwell et al., 1997; Nozaki et al., 1997; Shoda et al., 2000; Taylor et al., 1996), también se demuestra que el RNA empleado en la técnica está integro. Así, se puede con facilidad probar y amplificar otros fragmentos o receptores de hormonas como la prolactina (PRL).

6. CONCLUSIONES.

Esta investigación permite desarrollar la técnica RT-PCR con menos complicaciones para futuras investigaciones donde se requiera de amplificar citocinas o receptores de hormonas.

Permite relacionar la etapa de infección en la que se encuentra un animal con su estado fisiológico por medio de la amplificación de receptores de diferentes hormonas relacionadas con la inmunidad contra *M. bovis*.

Realizando la técnica de RT-PCR se tendrá un mejor conocimiento de cómo se da la infección en el hospedador.

El banco de muestras generado en esta investigación servirá para futuras investigaciones en las que se requiera realizar pruebas con animales desafiados con *M. bovis*.

En investigaciones posteriores se validará la información obtenida en esta investigación al poder emplear menos tiempo en el desarrollo de la técnica de RT-PCR y poder amplificar con diferentes iniciadores.

7. ANEXOS.

7.1. Anexo 1. Reactivos utilizados en la extracción de RNA.

- Solución de Hanks
 - Reactivo Hanks 5 g
 - Biocarbonato de sodio 35 mg
 - Ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1000 ml

- HCl 1 N
 - HCl concentrado 37% 85.5 ml
 - Aforar a 1000 ml

- Etanol al 75%
 - Alcohol etílico 75 ml
 - Agua-DEPC 25 ml
 - Almacenar a -20°C hasta su uso.

- Acetato de sodio 3 M pH 5.3
 - Acetato de sodio anhidro 12.045 g
 - Agua-DEPC 50 ml
 - Ajustar el pH con HCl antes de aforar y autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente.

- Cloroformo/Alcohol isoamílico (1:24)
 - Cloroformo 24 ml
 - Alcohol isoamílico (isopentanol) 1 ml
 - Almacenar protegido de la luz.

- Agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato)
 - DEPC 1 ml
 - Agua destilada desionizada 1 L
 - Agitar toda la noche. Esterilizar. Almacenar a 4°C.

7.2. Anexo 2. Reactivos utilizados en la electroforesis.

- Buffer de Corrimiento 5X
 - MOPS pH 7.0 0.1 M
 - Acetato de sodio 50.0 mM
 - EDTA pH 8.0 5.0 mM

- Buffer de Carga
 - Glicerol al 100% 5.0 ml
 - EDTA 1 mM pH 8 20 μ l
 - Azul de Bromofenol 2.5 mg
 - Xilencianol FF 2.5 mg
 - Agua-DEPC 50 ml
 - Almacenar a temperatura ambiente.

- Bromuro de Etidio
 - Bromuro de Etidio 1 ó 0.5 g
 - Agua-DEPC 1 ml
 - Almacenar a temperatura ambiente y protegido de la luz.

- TBE 10 X
 - Tris Base 108 g
 - Acido bórico 55 g
 - EDTA 200 mM pH 8.0 100 ml
 - Aforar a 1000 ml

- EDTA 200 mM pH 8.0
 - EDTA, sal disódica 7.45 g
 - Agua bidestilada 80 ml
 - Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 100 ml

7.3. Anexo 3. Valores obtenidos en la cuantificación.

MUESTRA	260 nm	280 nm
NL m 2	0.6859	0.4553
NL m 3	1.0579	0.6792
NL m 6	0.8281	0.5185
NL m 9	0.9571	0.6099
NL m 10	0.8055	0.5355
NL m 11	2.4038	1.4433
NL m 14	1.0009	0.6634
NL m 21 a	0.8736	0.5127
NL m 21 b	0.0078	-0.0380
NL m 24	1.7106	1.0467
NL tb 11 a	0.1299	0.0347
NL tb 11 b	0.2922	0.1928
NL tb 10	0.8490	0.5732
NL tb 17	1.0011	0.6671
NL tb 21	1.1613	0.7639
NL tb 23	0.9247	0.6691
NL rf 8	0.3476	0.2809
NL rf 12	0.5021	0.3021
NL rf 14	1.7723	1.1111
NL rf 16	1.2681	0.8136
NL rf 24	0.9052	0.6073

7.4. Anexo 4. Concentración de RNA.

	RT	GEL
MUESTRA	2 µg	4 µg
NL m 2	0.73 µl	1.5 µl
NL m 3	0.5 µl	1.0 µl
NL m 6	0.60 µl	1.2 µl
NL m 9	0.52 µl	1.1 µl
NL m 10	0.6 µl	1.2 µl
NL m 11	0.2 µl	0.4 µl
NL m 14	0.5 µl	1.0 µl
NL m 21 a	0.6 µl	1.2 µl
NL m 21 b	64 µl	128 µl
NL m 24	0.3 µl	0.6 µl
NL tb 11 a	3.9 µl	7.7 µl
NL tb 11 b	1.7 µl	3.4 µl
NL tb 10	0.6 µl	1.2 µl
NL tb 17	0.49 µl	1.0 µl
NL tb 21	0.4 µl	0.8 µl
NL tb 23	0.54 µl	1.1 µl
NL rf 8	1.44 µl	2.9 µl
NL rf 12	1.0 µl	2.0 µl
NL rf 14	0.3 µl	0.6 µl
NL rf 16	0.4 µl	0.8 µl
NL rf 24	0.5 µl	1.1 µl

7.5. Anexo 5. Mezcla empleada en la reacción de RT y de PCR.

Mezcla RT Vol 10 μ l

MEZCLA	1 MUESTRA
Buffer 5X	2 μ l
M DTT	1 μ l
DNTP	1 μ l
Oligo dT	1.6 μ l
Rnase Out	0.5 μ l
RT superscript	0.5 μ l
RNA c.b.p. 2 μ g	
H2O DEPC	c.b.p. 10 μ l

Mezcla de PCR Vol 10 μ l

MEZCLA	1 MUESTRA
Buffer 10 X	1 μ l
MgCl ₂	0.8 μ l
DNTP	1 μ l
β Actina F	1 μ l
β Actina R	1 μ l
Taq 5 U/ μ l	0.2 μ l
Producto de RT	2 μ l
H2O DEPC	c.b.p. 10 μ l

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Adams L.G. 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. Revision Science Technology: Mycobacterial infections in domestic and wild animals. 20: 304 – 317.
2. Adams R.L.P., Knowler J.T., Leader D.P. 1992. The biochemistry of the nucleic acids. Eleventh edition. Chapman & Hall. London.
3. Aldwell F.E., Wedlock D.N., Buddle B.M. 1997. Sequential activation of alveolar macrophages by IFN- γ and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. Immunology and Cell Biology. 75: 161 – 166.
4. Aoyagi K. 2001. PCR. Molecular biology problem solver a laboratory guide. USA. Pág. 291 – 329.
5. Ashford D.A., Whitney E., Raghunathan P., Cosivi O. 2001. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Revision Science Technology: Mycobacterial infections in domestic and wild animals. 20: 2 – 8.
6. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G. Smith J.A. Struhl K. 1999. Short protocols in molecular biology. Fourth Edition. USA
7. Avannis-Aghajani E., Jones K., Holtzman A., Aronson T., Glover N., Boian M., Froman S., Brunk C.F. 1996. Molecular technique for rapid identification of Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology. 34: 98 – 102.
8. Barrow W.W. 2001. Treatment of mycobacterial infections. Infection Revision Science Technology mycobacterial infections in domestic and wild animals. 20: 5 – 64.
9. Bernard D. 1987. Tratado de Microbiología. 4ª. Edición. Salvat Editores S.A México. Pág. 868 – 889.
10. Bordon R.H. 1978. Biosíntesis del RNA. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.
11. Booz M. 2001. Electrophoresis. Molecular biology problem solver a laboratory guide. USA. Pág. 331 – 371.

12. Carter G. 1994. Bacteriología y Micología Veterinarias. 2ª. Edición. Edit. Manual Moderno. México. Pág. 361 – 364.
13. Campañas Nacionales para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis en México (CANETB). 1997. Dirección General de Salud Animal (DGSA), Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria (CONASA). Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGAR). Informe anual de actividades.
14. Cassidy J.P., Bryson D.G., Pollock J.M., Evans R.T., Forster F., Neill S.D. 1998. Early Lesion Formation in Cattle Experimentally Infected With *Mycobacterium bovis*. *Journal Comp. Path.* 119: 27 – 44.
15. Cervantes O.R.A. 1993. Descripción de la tuberculosis y generalidades de la enfermedad en “Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis” 6-8. Comisión Nacional de erradicación de la tuberculosis y brucelosis. México, D.F
16. Chomczynski P. Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 152: 156 – 159.
17. Díaz O.F., Banda R.V., Jaramillo M.L., Arriaga D.C., González S.D., Estrada C.C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Méx.* 34, 13 – 26.
18. Dye C., Scheele S., Dolin P., Pathania V., Raviglione M.C. 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA.* 282: 677 – 86.
19. Erlich H.A. 1992. PCR technology. Principles and application for DNA amplification. Oxford, University Press. New York.
20. Estrada C.C. 1995. Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón gama y Elisa, basado en la inspección postmortem. Tesis de Licenciatura. FESC. UNAM.
21. Felton M.J., Vermeulen M.W. 1996. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infection and Immunity.* 64: 683 – 690.

22. Goodchild A., Clifton-Hadley R. 2001. Cattle to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis. 81:23 – 41.
23. Jiménez M. M., Báez S.R., Linares C.M., Chávez S.R., Lascurain L.R., Zenteno G.E. 2001. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. Rev. Int. Nal. Enf. Resp. Mex. 39 – 48.
24. Jones P., Qiu J. Rickwood D. 1994. RNA Isolation and analysis. BIOS Scientific Publishers Limited, 1994, Oxford, England.
25. Kaufmann S.H.E. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nature Reviews: Immunology. 1: 20 – 30.
26. Martin L.A., Smith T.J., Obermoeller D., Bruner B. Kracklauer M., Dharmaraj S. 2001. RNA purification. Molecular biology problem solver a laboratory guide. USA. Pag. 197 – 224.
27. Nozaki Y., Hasegawa Y., Ichiyama S., Nakashima I. Shimokata K. 1997. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages Infec Immun. 65: 3644 – 3647.
28. O'Reilly M.L. 1995. The usefulness of ELISA for the diagnosis of tuberculosis in man and animals: A review. Veterinary Reserch Laboratory. Dublin.
29. Parslow T.G., Stites D.P. Terr A.I., Imboden J. B. 2002. Inmunología Básica y Clínica. 10ª edición. Editorial El Manual Moderno México D.F.
30. Prince J.E., Kherad F., Corry D.V. 2003. Immunologic lung disease. Journal Allergy and Immunology. 111: 613 – 623.
31. Prediger E. Strategies for RNA isolation. The most critical step of RNA analisis. Ambion TechNotes
32. Radostits O.M., Gay C.C., Blod D.C. Hinchcliff K.W., 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de enfermedades del ganado. Volumen 1. McGraw-hill Interamericana. 1075 – 1088.
33. Rastrogi N., Legrand E., Sola C. 2001. The micobacteria: an introduction to nomenclature and patogénesis. Rev. Sci. Tech. mycobacterial infections in domestic and wild animals. 20: 21 – 54.

34. Rhodes S.G., Buddle B.M., Hewinson R.G., Vondermeier H.M. 2000. Bovine Tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease; *Immunology*. 99: 195 – 202.
35. Rosenberger G. 1983. Enfermedades de los Bovinos. 1ª. edición Edit. Hemisferio Sur. S.A. Buenos aires Argentina. Tomo-II p.139 – 151.
36. Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.P.R. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aus. Vet. Journal*. 67: 134 – 137.
37. Schlesinger L.S., Bellinger C.G., Payne N.R., Horwitz M.A. 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol*. 144. 2771-2780
38. Shoda L.K.M., Palmer G.H., Florin-Christensen J., Florin-Christensen M., Godson D.L. Brown W.C. 2000. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect Immun*. 68: 5139 – 5145.
39. Sut A., Sirugue S., Sixou S., Lakhdar – Ghazal F., Tocanne J F., Laneelle G. 1990. Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: alteration of model and natural membranes. *Biochemistry*. (36) 29: 8498 – 502.
40. Taylor K., Lutje V. Mertens B. 1996. Nitric oxide synthesis is depressed in *Bos indicus* cattle infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* and does not mediate T-cell suppression. *Infect. Immun*. 64: 4115 – 4122.
41. Tizard I. 1987. *Inmunología Veterinaria*. 3ª. Edición. Edit. Interamericana. McGraw-Hill. México.
42. Torres L.R. 2005. Correlación histopatológica de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina con la presencia de *Mycobacterium bovis*, analizada mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis de Licenciatura. FESC. UNAM.
43. TRIzol™ Reagent (Total RNA Isolation Reagent). Life Technologies.

44. Vondermeier H.M., Cockle P.J., Whelan A.O., Rhodes S., Chambers M.A., Clifford D., Huygen, Tascon R., Lowrie D., Colston M.J., Hewinson R.G. 2003. Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. *Vaccine* 2000. 19: 1246 – 1255.
45. Wagner V., Burkhardt E., Failing K. 1999. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70: 151 – 159.
46. Walker J.M. 1988. *Methods in molecular biology. Volume 4. New nucleic acid techniques.* Humana Press. Clifton, New Jersey.
47. Weldlock D.N., Andwell F.E., Collins D.M. De Lisle G.W. Wilson T. Buddle B.M. 1999. Immune response induced in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: Correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophages. *Infection and immunity* 67: 2172 – 2177.