



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
DEPTO. MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DEL GENOMA DEL
VIRUS DE LA RABIA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A PARTIR DE MUESTRAS
DE TEJIDO NERVIOSO FIJADAS EN GLICERINA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARCO ANTONIO JESÚS SAAVEDRA MORALES

CD. OBREGÓN, SONORA

JULIO DEL 2001

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA RABIA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO FIJADAS EN GLICERINA.

TEMA DE TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARCO ANTONIO JESÚS SAAVEDRA MORALES

ASESORES:

M.C. JAVIER ROLANDO REYNA GRANADOS

Vo. Bo

M.A. CARLOS MARTÍN AGUILAR TREJO

COORDINADOR DE LA CARRERA DE M.V.Z.

COMITÉ:

PRESIDENTE: _____

SECRETARIO: _____

VOCAL: _____

DEDICATORIA

A MI MADRE

Adela Morales Ruiz por darme la inspiración de ser cada día mejor y luchar contra toda adversidad. Impulsaste en mi el espíritu de ir siempre adelante motivándome cada vez que tropezaba, mostrándome el camino a seguir para poder lograr lo mejor. Tu Amor incondicional es lo mas importante en mi vida, ya que me has dado lo mejor de ti.

¡¡GRACIAS MAMÁ!!

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por prestarme vida, darme fortaleza y sabiduría para concluir con mi carrera profesional.

A MIS PADRES

Adela Morales Ruiz y Marco Antonio Saavedra Lamadrid, por concebirme y darme la oportunidad de vivir, también por hacerme un hombre de provecho y por la confianza que han depositado en mi a pesar de las muchas veces que he tropezado y algunas veces defraudado

¡MUCHAS GRACIAS!

A MI TIO

Armando Navarro Ayon, por esas palabras de aliento cuando mas las necesite, ha sido para mi como un padre al cual admiro y respeto.

A LA FAMILIA NAVARRO MORALES

Armando, Manuelita, Keila y Magdiel, por el apoyo, la confianza y el amor que me han brindado.

A MI ASESOR

J. Rolando Reyna Granados, por la confianza que deposito en mi, por el tiempo que invirtió, por sus consejos, por compartir sus conocimientos para la realización de este trabajo, por su amistad.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en especial al Phd J. Álvaro Aguilar Setien y colaboradores por la disponibilidad y la colaboración para llevar a cabo este trabajo.

A MIS REVISORES

MD Isabel Angeles de la Llave, MA Carlos Martín Aguilar Trejo y MC Javier Arturo Munguía Xóchihua, por su tiempo y dedicación para la corrección y perfección de este trabajo.

A TODOS MIS MAESTROS

Por hacer de mi un Médico Veterinario Zootecnista. En especial a la Dra. Isabel, por todo el tiempo que compartimos juntos, la confianza que deposito en mi y la oportunidad que me brindo de ser su ayudante durante 3 años, los cuales fueron de mucha utilidad para mi formación profesional.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

Por haberme apoyado y haber compartido tan gratos momentos.

A LA SRITA. MA. DEL PILAR MALDONADO GONZÁLEZ

Por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo, por el ejemplo de honestidad y dedicación, por esos momentos de tristeza y felicidad que hemos pasado juntos, por permitirme formar parte de tu vida.

A LA FAMILIA MORALES PABLOS

Por haberme abierto las puertas de su hogar y brindarme su amistad y el amor de una familia.

CONTENIDO

Resumen	viii
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras	x
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Definición	6
2.3. Sinónimo	7
2.4. Etiología	7
2.5. Serotipos del <i>Lyssavirus</i>	7
2.6. Morfología	8
2.7. Epizootiología	9
2.8. Huésped	11
2.9. Transmisión	11
2.10. Patogenia	12
2.11. Signos clínicos	12
2.12. Diagnóstico	13
2.13. Biología molecular para el estudio de la Rabia	14
III. Material y métodos	17
3.1. Clasificación del estudio	17
3.2. Criterios de inclusión	17
3.3. Recolección de muestras positivas	18
3.4. Extracción del ácido ribonucleico (ARN)	18
3.5. Empleo de oligonucleotidos específicos	19
3.6. Elaboración del ácido desoxiribonucleico (ADN)	20
3.7. Amplificación de los productos por la técnica de PCR	20

3.8. Observación de la amplificación de un gel de agarosa por medio de la técnica de electroforesis	21
IV. Resultados y discusiones	22
Conclusión y recomendaciones	25
Literatura citada	28

RESUMEN

Saavedra Morales Marco A. Jesús. Amplificación de la región variable del genoma del virus de la rabia por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de tejido nervioso fijadas en glicerina. Asesor: M.C. Javier Rolando Reyna Granados.

Con el objetivo de amplificar la porción mas variable del genoma del virus de la rabia, se tomaron 10 muestras de encéfalos positivos a rabia por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, fijadas en glicerina. Dichas muestras fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la coordinación de investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, a las cuales se les realizaron las técnicas de Biología Molecular de extracción ácido ribonucleico, en donde se utilizaron cebadores específicos para la identificación de dicha porción, y elaborando el ácido desoxiribonucleico complementario, con el cual se corrió la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. En este trabajo se obtuvieron amplificaciones de 878 pares de bases, las cuales se observaron por medio del desplazamiento molecular en el gel de agarosa, con la técnica de electroforesis lo que permitió concluir que la amplificación de la porción variable del genoma del virus de la rabia en muestras fijadas en glicerina se puede extraer satisfactoriamente y servir como base para futuros estudios epidemiológicos de la enfermedad de la rabia.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de las técnicas realizadas en cada una de las muestras	27
--	--------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Forma ojival del virus de la rabia	10
Figura 2. Representación esquemática de las proteínas del virus de la Rabia	10
Figura 3. Canino en etapa furiosa de la Rabia	13
Figura 4. Fotografía de un desplazamiento molecular en un gel puesto en un transluminador de luz ultra violeta	24

I. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se han realizado diversos estudios a cerca del virus de la rabia ya que se considera una de las enfermedades más antiguas. Además de ser una zoonosis de gran importancia dentro de la salud pública, ya que la rabia es una infección viral aguda del sistema nervioso central transmitida por secreciones infectadas, generalmente saliva. La mayoría de las veces, la exposición a éste virus se realiza por la mordedura de un animal afectado. El primer paso es la introducción del virus vivo a través de la piel o mucosas. Una vez en el organismo parece ser que el virus empieza a replicarse en el músculo estriado del sitio donde ha sido depositado. Seguidamente, el sistema nervioso periférico (que inerva los músculos) se infecta a nivel de la unión del nervio con el músculo o el nervio con el tendón. Posteriormente el virus asciende hasta el sistema nervioso central

donde vuelve a reproducirse pasando a otros tejidos como: Glándulas salivales, medula suprarrenal, riñón, pulmón, hígado, músculo esquelético, piel y corazón.

Su paso a la glándula salival facilita su transmisión a través de la saliva. El período de incubación de esta enfermedad oscila entre 10 días y más de un año (promedio normal de 1 a 2 meses).

Existen desde el punto de vista epidemiológico dos tipos de rabia: La urbana: propagada principalmente por perros o gatos no vacunados y la selvática: transmitida por mofetas, mapaches, ardillas, mangostas, lobos y murciélagos.

En la mayor parte del mundo el perro es el principal transmisor del virus de la rabia al hombre. Con todo son importantes transmisores de esta enfermedad: el lobo (este de Europa), la mangosta (sur África, el Caribe,) el zorro (Europa occidental) y los murciélagos (Latinoamérica).

Muchos científicos han dedicado mucho tiempo de su vida para identificar, comprender, controlar y erradicar esta enfermedad. La mayoría tiene conocimientos respecto a su clasificación, estructura, diagnóstico y aspectos epidemiológicos. A través de los años las técnicas para estudiar más detalladamente a los virus se han ido perfeccionando, en algunas se han encontrado detalles enormes que las obligan a modificarlas, o bien, se pueden llegar hasta eliminar. Hoy en día, y específicamente sobre el virus de la rabia, se realizan estudios más sofisticados para conocer a fondo las variantes de la

información genética, para esto se han utilizado pruebas como anticuerpos monoclonales, extracción del ácido ribonucleico (RNA, por su siglas en ingles) viral, elaboración de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) y replicación viral por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hasta estudios de caracterización por medio de secuencias parciales usando la técnica de RFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción), REA, o bien, caracterizaciones más finas por medio de aparatos secuenciadores especializados.

En la actualidad se tiene bien establecido la secuencia total de las proteínas que codifican al genoma del virus de la rabia, por lo que se ha logrado satisfactoriamente estudiar una proteína (proteína N) para el diagnóstico de los Lyssavirus, la cual ya es usada en México. Por otro lado, en Francia, EUA, Canadá y recientemente en México, se están realizando estudios sobre la proteína variable (proteína G) para realizar investigaciones de epidemiología molecular.

Algunos laboratoristas sumergen sus muestras en glicerina para conservación en congelación, después, estas muestras se pueden seguir procesando por medio de técnicas para la histopatología. El poder extraer la porción variable del genoma del virus de la rabia sería muy importante ya que con ello se podría realizar estudios de epidemiología molecular.

Es por lo anterior, el interés de realizar este estudio, con la finalidad de poder obtener, de muestras encefálicas positivas a rabia por Inmunofluorescencia y

conservadas con glicerina, la porción variable de dicho genoma. De esta forma se podrá contribuir a incrementar la poca investigación referente que existe hasta el momento, además de aportar un avance para la continuación de estudios de la epidemiología molecular del virus de la rabia en México.

El objetivo de este trabajo consiste en Amplificar la porción variable del genoma del virus de la rabia, por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de muestras de tejido nervioso fijadas en glicerina.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

La enfermedad de la rabia se conoce desde hace muchos siglos en Europa. Los colonos la introdujeron a América al traer perros infectados (Correa, 1988). La infección natural ocurre por mordedura de animales rabiosos.

La rabia, fue descrita en animales domésticos desde 500 años a.C. y ha sido una de las enfermedades mortales más temidas por hombre.

En 1804, Zinke citado por Mohanty en 1983, reconoce la naturaleza infecciosa en la saliva de un perro infectado. Mientras en 1881, Pasteur mencionado por Mohanty en 1983, demostró por primera vez el neutropismo del

virus de la rabia, así mismo corresponde el mérito de haber efectuado la inoculación con una vacuna antirrábica a un niño mordido por un lobo infectado en 1885.

En 1903, Remlingen mostró la naturaleza viral por su calidad filtrante, en el mismo año Negri señala el diagnóstico por inclusiones intracitoplasmáticas específicas en células nerviosas.

La enfermedad ocurre en todas partes del mundo, si bien en algunas áreas de E.U. se ha erradicado la rabia por establecer medidas profilácticas y de control. (Mohanty y Dutta, 1983).

2.2 Definición.

La rabia es una enfermedad neurológica viriosa de los animales de sangre caliente que con raras excepciones es fatal (Ettinger, 1992). Puede considerarse de alta mortalidad y se trasmite por las mordeduras de los animales afectados. Se manifiesta por irritación motora con signos clínicos de trastornos del sistema nervioso central y complejo de ataque, y por una parálisis ascendente. Tiene un curso agudo y mortal. (Blood, et al, 1992).

2.3 Sinónimo.

En México se le conoce como hidrofobia, a la enfermedad en bovinos se le conoce como derriengue, derrengue, derrengado, tronchado y huila, En Brasil como peste das cadeiras. En Paraguay tumbi-baba. En Argentina, mal de caderas bovino y rabia persistente (Correa, 1988).

2.4 Etiología.

Es un virus de una sola cadena de ARN no segmentado y de polaridad negativo perteneciente a la familia de los mononegavirales. El comité internacional de taxonomía viral-ictv lo clasifica en 4 familias que son la *Paramixoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* y *Rhabdoviridae*. Los *Rhabdoviridae* que infectan a los mamíferos se dividen a su vez en 4 generos que son: *Vesiculovirus* (cuyo modelo es el virus de la estomatitis vesicular), *Ephemerovirus* (cuyo modelo es el virus de la fiebre efímera bovina), *Noravirhadbovirus* (cuyo modelo es el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa), y los *Lyssavirus* (cuyo modelo es el virus de la rabia) (Reyna, 2000).

2.5 Serotipos de Lyssavirus

De el género *Lyssavirus*, se han caracterizado diferentes serotipos:

Serotipo 1, virus de la rabia clásica: comprendiendo a la cepa prototipo de desafío Challenge Virus Stand (CVS), y a la mayoría de los virus de campo

aislados de mamíferos terrestres, también incluye cepas del virus fijo de laboratorio.

Serotipo 2, virus Lagos bat: Primeramente aislado de una mezcla de cerebro de murciélagos en Nigeria (Lagos bat 1), después se aisló en un murciélago de la República Centroafricana (Lagos bat 2) y un tercero aislado en un murciélago de Guinea y un gato en Zimbabwe (Lagos bat 3).

Serotipo 3, virus Mokola: Aislado por primera vez de musaraña de Nigeria y luego de un humano (Mokola 1), después se encontró en musarañas de Camerún (Mokola 2) y luego fue aislado de perros de Zimbabwer (Mokola 3).

Serotipo 4, virus Duvenhage: Primero se aisló de un humano de Sudáfrica (Duvenhage 1), después de un murciélago de Sudáfrica (Duvenhage 2) y finalmente de murciélago de Zimbabwe (Duvenhage 3).

Lyssavirus no clasificados, Lyssavirus de murciélago Europeo (EBL1), Lyssavirus del género Europeo 2 (EBL2), Lyssavirus del murciélago Australiano.

2.6 Morfología

Consta de una envoltura con espículas, estructura helicoidal interna, ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa, de estructura morfológica

muy particular en forma de bala de fusil y propiedades físico-químicas y de replicación en el citoplasma (Montaño y Mata, 1996).

Los Rhabdovirus son virus frágiles, inactivados por el calor, rayos ultra violeta, desecación, solventes orgánicos y la tripsina. Son bastante estables en Ph 5 y 10. Se conservan varios días a 4° C y por mucho tiempo a -70° C y liofilizados.

El virus tiene una forma ojival truncada y mide 180 nm de largo por 75 nm de ancho (Figura 1). Esta constituido por 5 proteínas que codifican al genoma: L (2142 aminoácidos), G (504 aminoácidos), N (450 aminoácidos), NS o M1 (297 aminoácidos), M (202 aminoácidos) (Figura 2). Estas se encuentran codificadas por el ARNviral, distribuidas en 2 componentes principales que son la nucleocapside (NC) y la envoltura o cápside (Montaño y Mata, 1996).

2.7 Epizootiología.

La rabia se presenta en todos los continentes con excepción de la mayor parte de Oceanía. En la actualidad, varios países están libres de la infección, entre ellos Uruguay, Barbados, Jamaica y otras islas del Caribe en las América; Japón en Asia; varios países escandinavos, Irlanda, Gran Bretaña, Países Bajos, Bulgaria, España, y Portugal en Europa. La rabia no tiene una distribución uniforme en los países infectados, ya que en muchos de ellos existen áreas libres, de baja y alta endemicidad y otros brotes epizootémicos (Acha, 1992).

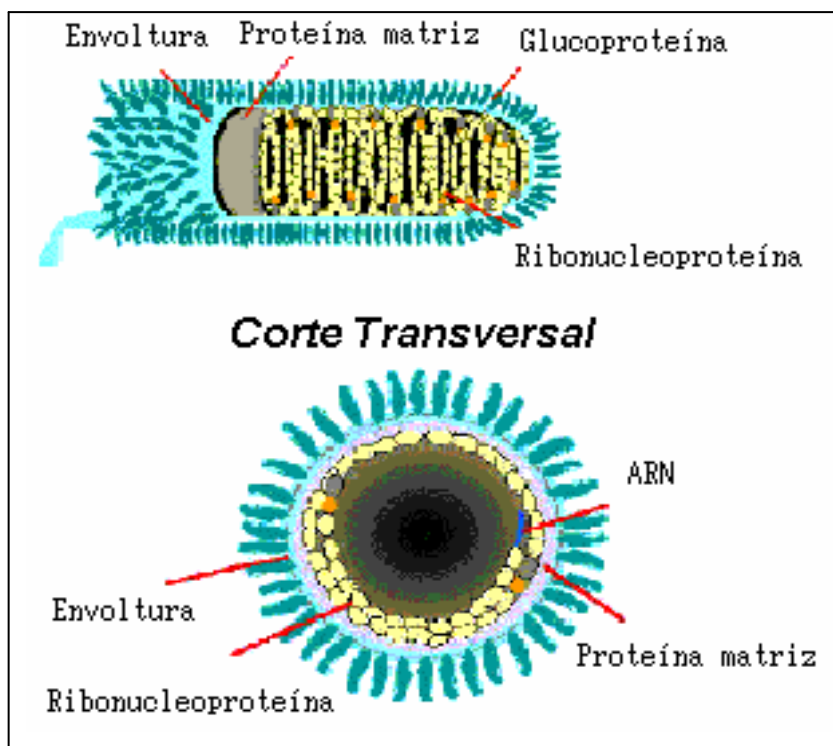


Figura 1 Forma ojival del virus de la rabia
(Wunner 1999, Conzelmann 1998)

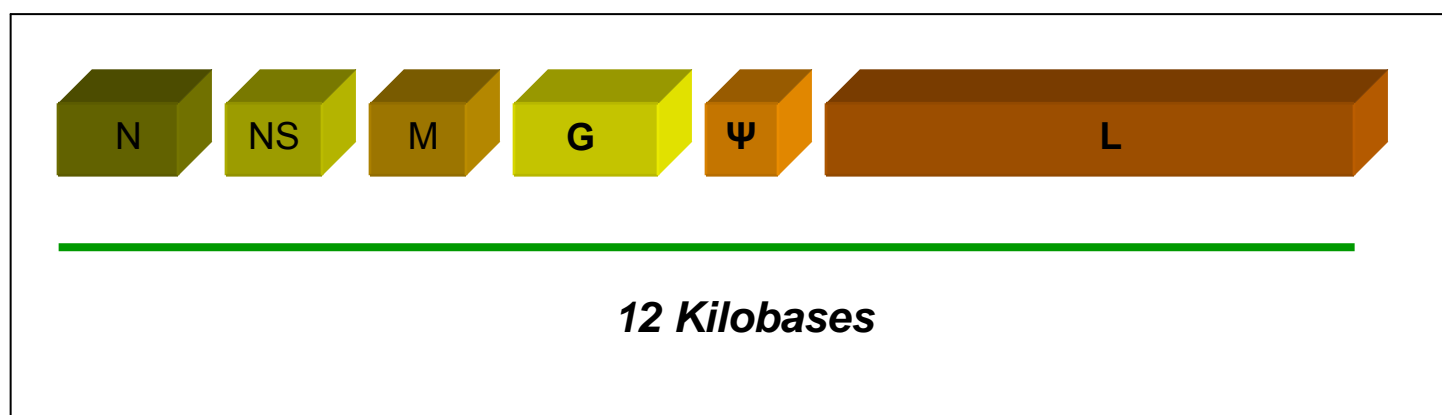


Figura 2 Representación esquemática de las proteínas del virus de la rabia

2.8 Huésped.

La rabia, es una enfermedad transmisible que la padecen todos los animales mamíferos de sangre caliente incluido al humano. Su letalidad es del 100 % y la susceptibilidad varía de acuerdo a diferentes especies animales.

Se presentan 4 tipos de susceptibilidad muy alta como: zorros, coyotes, chacales, lobos, rayas y ratones; alta como: hámster, zorrillos, mapaches, gatos, murciélagos; moderada: perros, ovejas, cabras, caballos, primates; y baja como la zarigüeya (Loza, 1995).

2.9 Transmisión.

Se transmite en la saliva en una herida por mordedura profunda o de un animal a otro o a partir de un animal al hombre por mordedura o rasguño del individuo rabioso (Birchard, 1996).

El periodo de incubación varía desde aproximadamente 8 días a 3 meses o más (Runnells, 1982).

La saliva sirve al virus como medio de transporte o vehículo para que se introduzca por medio de mordedura o lamedura en una lesión reciente de la piel. La transmisión natural depende de la relación existente entre el infectado y el posible infectante, la densidad y el estado inmune de la población (Baer, 1982).

2.10 Patogenia.

La saliva en una herida o mordedura profunda, entra al tejido nervioso periférico (NP), se disemina en forma centrípeta a lo largo de los NP a la médula espinal y el cerebro. Ocurriendo la diseminación centrífuga a lo largo de los nervios periféricos del cerebro a otros tejidos, como las glándulas salivales (Birchard, 1996).

El periodo de incubación antes de que aparecieran los signos es muy variable a menudo es de 2 a 8 semanas. La eliminación por saliva empieza en corto tiempo (menos de 10 días) antes de que aparezcan los signos (Birchard, 1996).

2.11 Signos Clínicos.

Se dividen en 3 fases:

- Prodrómica (2 – 3 días)

En esta fase suele pasar inadvertida, pero puede haber signos sutiles de cambio de comportamiento, fiebre, reflejos corneales y palpebrales lentos y morderse en el sitio de la lesión.

- Furiosa (2 – 4 días)

Inicialmente el sistema límbico del SNC es invadido, lo que ocasiona signos de comportamiento errático, como irritabilidad, inquietud, ladridos, agresión episódica, ataques viciosos a objetos inanimados, gruñidos inexplicables y

comportamiento sexual anormal (Figura 3). Puede desarrollarse ataxia, desorientación y convulsiones.



Figura 3 Canino en etapa furiosa de la rabia.

- Parálitica (2 – 4 días)

Se desarrolla parálisis de neuronas motoras inferior, que causa signos de paresia o parálisis ascendente de los miembros, parálisis laríngea, parálisis faríngea (babeo, disfagia) y parálisis masticatoria (mandíbula caída). Seguido por depresión, coma y muerte por parálisis respiratoria (Birchard, 1996).

2.12 Diagnóstico.

Para su diagnóstico se debe considerar la historia clínica, signos y lesiones. Se pueden emplear pruebas biológicas, como la inoculación de ratones para el aislamiento del virus, la cual sigue siendo una de las pruebas más útiles para el diagnóstico de la rabia (Acha, 1992). Pruebas en tejido como Anticuerpos fluorescentes confiable o específico. Las muestras son cerebro y cerebelo (cuerno de Amón) (Correa, 1988). Combinado con pruebas de laboratorio como

inmunofluorescencia indirecta, permitiendo realizar pruebas in vitro. Tinciones (Seller de un 3 a 19 % de los casos) intracitoplasmáticas eosinofílicas (corpúsculos de Negri) (Correa, 1988).

Las pruebas serológicas, por medio de la titulación de anticuerpos rábico, seroneutralización, contraelectroforesis, prueba de enzimas ligadas a inmunoadsorción (ELISA), la prueba de reducción de placas, la radioinmunoensayo (RIA), pruebas de hemoabsorción, pruebas de fijación de complemento, la inmunoadherencia, hemoaglutinación, pruebas basadas en la hemaglutinación, la inhibición de la hemaglutinación indirecta, la hemaglutinación pasiva o indirecta (Loza, 1995).

Una de las pruebas más sofisticadas en la actualidad es el diagnóstico por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Barrera, 1993).

2.13 Biología molecular para el estudio de la rabia.

En los últimos años la biología molecular se ha venido desarrollando a enormes pasos, desde 1985, cuando Kary Mullis, se preocupó por una simple amplificación del genoma hasta finales de siglo XX en donde ha servido como una gran herramienta para el diagnóstico y la tipificación de especies.

Dentro de las técnicas de biología y epidemiología molecular empleadas se pueden mencionar métodos modernos que facilitan un estudio más amplio de la

enfermedad, y en sí, del agente etiológico. Además, permite que la investigación científica se oriente a identificar, estudiar y aprovechar genes, así como a entender la organización y evolución del genoma (Alonso, 1997).

Entre algunas de las técnicas empleadas se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual se utiliza para amplificar total o parcialmente al genoma DNA de interés, algunas otras consisten en realizar un ácido desoxiribonucleico complementario (DNAc) a partir de genomas de RNA, con lo que se usa la técnica de transcriptasa reversa de la PCR (RT-PCR) (Milián, 1998). Otra técnica que se emplea frecuentemente es la técnica de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), ésta identifica las diferencias genéticas entre cepas por el patrón que forman los fragmentos del DNA en geles de agarosa o poliacrilamida después de que el DNA ha sido cortado con enzimas de restricción e hibridado con sondas marcadas en un análisis de Southern blot.

La técnica de polimorfismo por amplificación de secuencias aleatorias (RAPDs, por sus siglas en inglés) determina diferencias entre cepas por los patrones de bandas que son producto de la amplificación de secuencias aleatorias del DNA. Esto es, la amplificación con el uso de un solo primer de secuencia aleatoria de entre 10 y 12 nucleótidos de largo.

La técnica de repeticiones cortas en serie (STRs, por sus siglas en inglés) se basa en el hecho de que las mutaciones que producen nuevas cepas pueden ocurrir por eliminación o adición de nucleótidos en las repeticiones en serie.

Entre otras técnicas que se derivan de la biología molecular se pueden mencionar a: regiones amplificadas de secuencia caracterizada (SCARs), reacciones de amplificación con primer térmico (SPARs), repeticiones de secuencia simple (SSRs) y cadenas simples, secuencias polimórficas cortadas y amplificadas (CAPs) (Milián, 1998).

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Clasificación del estudio:

Se clasifica como un estudio de tipo observacional, descriptivo (Dawson, 1993)

3.2 Criterios de inclusión:

Se incluyeron muestras positivas a rabia por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), una vez extraído de ratones inoculados; y posteriormente fijadas en glicerina. Además se incluyeron 2 muestras procedentes de cultivos celulares Línea BHK.

3.3 Recolección de muestras positivas

Se recolectaron y se trabajaron muestras de tejido encefálico de ratones (cepas originales, PV y virus calle de perro) fijadas en glicerol en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la coordinación de investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

3.4 Extracción del ácido ribonucleico (ARN).

Se tomaron 0.5 cm³ de diámetro aproximadamente de la muestra de cerebro positiva a rabia por medio de IFD fijada en glicerina. Se depositó en un tubo eppendorff de 1.9 µl para disociar los complejos nucleoproteicos y utilizando una técnica comercial para extracción de RNA, se homogenizaron y maceraron en presencia de Trizol (1 ml) y se incubó por 5 minutos a una temperatura de 15 a 30 °C. Posteriormente se separó el ARN de las muestras añadiendo 0.2 ml de cloroformo e incubándose por 2 ó 3 minutos a la misma temperatura (temperatura ambiente del laboratorio), se procedió a centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos de 2 a 8 °C. En seguida se observó la formación de un concentrado o botón blanco (material genético), él cual quedó unido al fondo del microtubo. Decantando el sobrenadante, dicho botón se lavó con 1ml de etanol al 75 %, mezclando vigorosamente hasta desaparecerlo, para posteriormente centrifugar a 7500 rpm durante 3 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C. Por ultimo se recuperó el ARN, una vez mas en etanol, decantando el sobrenadante y

colocando el microtubo boca abajo para un secado completo por evaporación (se conservó únicamente el botón de ARN). Cuando ya seco, se disolvió el botón de ARN con 50 μ l de agua ultrapura y se incubó a baño maría a una temperatura entre 55 y 60 $^{\circ}$ C por 10 minutos y luego se almacenó a -70° C (Reyna, 2000).

3.5 Empleo de oligonucleotidos específicos.

Se identificó la porción más variable y de interés (porción G Ψ L), y después se solicitó a una empresa comercial la fabricación de 2 iniciadores, cebadores o primers específicos, estos primer fueron:

Cebador GCII: 5'-GAC TTG GGT CTC CCG AAC TGG GG-3' 23 bases sentido(+)

Posición	4665	4687
----------	------	------

Cebador G8: 5'-CAA AGG AGA GTT GAG ATT GTA GTC-3' 24 bases sentido (-).

Posición	5543	5520 ó antisentido.
----------	------	---------------------

Ambos iniciadores no codifican al pseudogen (Ψ) (Sacramento, Bourhy y Tordo 1991; Tordo-Bradane, 1995).

3.6 Elaboración del ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc)

Con el objeto de desligar las cadenas del ARN se sometieron 2 μ l de material genético con 2 μ l de iniciador GCII (1 μ M) a una temperatura de 100°C por 2 minutos, pasado el tiempo, se procedió a enfriarse inmediatamente (sumergiendo las muestras en hielo) dicha acción de enfriamiento detuvo la reacción de fragmentación de ARN y es entonces, cuando los iniciadores GCII se unieron, en teoría, a su sitio específico. Enseguida se homogenizó con 8 μ l de una mezcla preparada previamente, la cual contenía un 1 μ l de DTT (100 mM), 2 μ l de solución buferada (1X), 4 μ l de desoxinucleótidos (100 mM de c/u), 0.1 μ l de reactivo RNAsin (4 U; Promega), 0.6 μ l de Transcriptasa Reversa (200 U; Superscript BRL) y 0.3 μ l de agua pirolizada y/o ultrapura. Se incubó a baño María por un una hora a 37 °C. Finalmente se diluyó con 60 μ l de solución buferada de TE 1X y se conservó a una temperatura de -20 °C (Sacramento, Bourhy y Tordo, 1991; Reyna y col, 2000).

3.7 Amplificación de los productos por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles).

Para efectuar la amplificación del fragmento de ADNc de interés (porción G- ψ -L) se procedió a diluir 5 μ l de DNAc (1 μ g/ μ l) en 43 μ l de reacción compuesta por 2 μ l de los cebadores GCII y 2 de G8 (200 ng/ μ l, c/u), 1 μ l de cada nucleótido trifosfato (10 mM), 5 μ l de solución buferada IX (20 mM Tris-HCl -1mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.5% Nonidet P40 (v/v), 0.5% Tween 20 (v/v), 50% glicerol

(v/v), pH 8.0 (4 °C); y 0.7 µl de taq-polimerasa recombinante (1 unidad/0.2 µl). Se aforó con 29.3 µl de agua pirolizada y se ajustó el aparato de polimerización en cadena (termocicador) a 30 ciclos contemplando una temperatura de desnaturalización a 95°C por 60 segundos, una de alineamiento a 45°C por 90 segundos y una de elongación a 72°C por 15 segundos (Sacramento et al, 1991; Tordo et al, 1993; Reyna y col, 2000).

3.8 Observación de la amplificación de un gel de agarosa por medio de la técnica de electroforesis.

Cada amplicón obtenido se analizó al observarse con una prueba de electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en solución de TAE buferada 1 X con bromuro de etidio (1ng/ml). Se efectuó la migración de las muestras con la aplicación de una corriente de 100 volts por 35 minutos. Por ultimo, de la migración o desplazamiento molecular, se observó por medio de un transluminador de luz ultravioleta, lo cual permitió realizar conclusiones pertinentes (Kurstack y col. 1994, citado por Reyna, 2000).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se trabajaron 10 muestras de encéfalos positivos a rabia por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) las cuales procedían del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Dichas muestras pertenecían, 4 a la Cepas Virus Pasteur (PV), donde 2 se trabajaron directamente de encéfalos fijados en glicerina (sumergidas por 72 horas) y las otras 2 estaban sembradas en cultivo celular de la línea celular BHK; por otro lado, las 6 restantes pertenecían a la cepa terrestre las cuales eran de un canino.

Se logró extraer el RNA para después realizar la elaboración del DNAc, así pues, una vez realizado, se logró amplificar la porción variable del genoma del virus de la rabia utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cuadro 1), los fragmentos obtenidos en el producto de PCR fue 878 pares

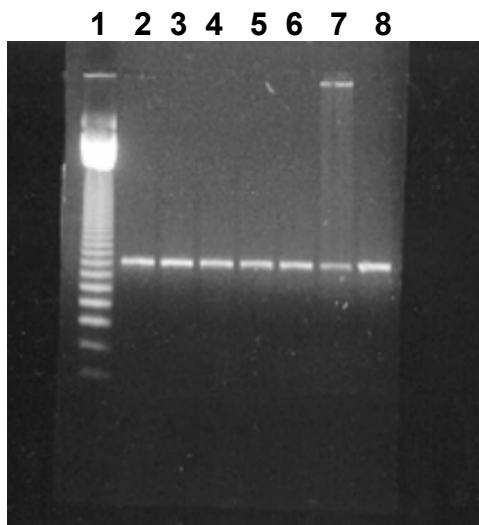
de bases (pb) lo que coincide con los trabajos realizados por Sacramento (1991), Tordo (1995) y Reyna (2000) quienes utilizaron la misma porción variable (G-ψ-L) del genoma pero utilizando muestras frescas de cerebro positivas a rabia.

Los resultados de este trabajo coinciden con los estudios realizados por McColl et al., (1993), y Orciari et al., (1999), a diferencia que ellos trabajaron muestras fijadas en formalina, amplificando la porción mas conservada (N).

El amplicón que se obtuvo y se analizó en este trabajo con la prueba de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se observó la migración de las muestras, obteniendo el desplazamiento molecular, el cual se apreció en un transluminador de luz ultravioleta (Figura 4) .

El peso molecular utilizado fue el DNA Ladder 123 pb, con el cual coincidían los productos de PCR obtenidos a la altura de la séptima línea del peso molecular aproximándose a los 878 pb, esto concuerda con los resultados obtenidos por Sacramento (1991), Tordo (1995) y Reyna (2000).

figura 4. Fotografía de un desplazamiento molecular en un gel puesto en un transluminador de luz ultra violeta



En el primer carril se observa el peso molecular. En el carril 2° y 3° se observa el desplazamiento de las muestra PV. El carril 4° y 5° se observa el desplazamiento de las muestra PV (CC). El carril 6°, 7° y 8 se observa el desplazamiento de las muestras Cepa terrestre. Ambas muestras se aproximan a la 7° línea, indicando que su peso molecular es de aproximadamente de 878 pb.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La amplificación de la porción variable del genoma del virus de la rabia de muestras fijadas en glicerina pueden ser extraídas satisfactoriamente y se concluye que pueden amplificarse otros fragmentos de Lyssavirus como lo estudió McColl et al., (1993), con la proteína N del genoma (porción más conservada) de un Lyssavirus de murciélago frugívoro Australiano. Aunque se tiene que mencionar que la muestra que trabajaron se encontraba fijada en formalina.

Se recomienda realizar extracciones de la porción variable del genoma de muestras fijadas en formalina, ya que los laboratorios de diagnóstico por histopatología conservan un gran número de ellas en este reactivo y estas condiciones no permiten emplear estudios de Biología Molecular, por lo que se tiene que retirar la formalina de dichos tejidos para después extraer el material

genético. Estas muestras podrían proporcionar un buen estudio epidemiológico de la enfermedad de la rabia, cabe mencionar que este tipo de estudios se han realizado también en Canadá por Orciari et al., (1999) y no se han reportado en México. Se podrían estudiar otras porciones del genoma del virus de la rabia de muestras fijadas en glicerina o de muestras infectadas en cultivo celular de la línea BHK.

CUADRO 1. RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS REALIZADAS EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS.

CEPA	Extracción de RNA	Extracción de DNAc	Amplificación en PCR
PV	+	+	+
PV	+	+	+
PV (CC)*	+	+	+
PV (CC)	+	+	+
Cepa Terrestre**	+	+	+
Cepa Terrestre	+	+	+
Cepa Terrestre	+	+	+
Cepa Terrestre	+	+	+
Cepa Terrestre	+	+	+
Cepa Terrestre	+	+	+

PV= Cepa de Laboratorio Virus Pasteur

*** Cepa Pasteur en Cultivo Celular**

**** Cepa de Perro Infectado**

+ Representa el resultado positivo

LITERATURA CITADA

Acha N.P. 1992 Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª edición Publicación científica No. 503 OPS/OMS Washington, D.C. pp. 503, 514

Alonso M.R.A. Hacia un proyecto nacional de investigación en genomas de animales domésticos. Vet. Méx. 28 : (4) 1997 pp. 365

Baer, M.G. 1982 Rabia: epidemiología, diagnóstico, vacunación, prevención y tratamiento en el hombre. Prensa Médica Mexicana, S.A. México D.F., 126,128.

Barrera S.H. 1993 Reacción en cadena de la polimerasa, una nueva época dorada en la biología molecular. Instituto de investigaciones forestales y agropecuarias, inifap. México pp. 50

Birchard S.J. 1996 Manual clínico de pequeñas especies. Vol. 1 y 2. Editorial Interamericana Mcgraw-Hill. México, D.F.

Blood D.C., Radostits O.M., Arundel J.H., Gay C.C. 1992 Medicina veterinaria. Vol. 2. 7º edición. Editorial Interamericana Mcgraw-Hill. Madrid, España. pp. 990 - 995

Conzelmann K.K. 1998. Nonsegmented negative-stranded RNAviruses: Genetics and manipulation of viral genomes. Ann. Rev. Genet. 32:123-162.

Correa G.P. 1988 Enfermedades virales de los animales domésticos. Poligasticos. Vol. 2. 5º edición. Editorial Paradigmas. México, D.F. pp. 5 – 33

Dawson S.B., Trapp R.G. 1993 Bioestadística médica. Manual moderno. México, D.F. pp. 8

Ettinger S.J. 1992 Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. 3° Edición Vol. 1. Inter-médica. Los Ángeles California. pp. 319 – 322, 346 – 347, 640 - 641

Loza R.E. 1995 Técnicas serológicas para el diagnóstico de rabia. Folleto técnico No.1. Proyecto de vigilancia epidemiológica. Instituto de investigaciones forestales y agropecuarias México. pp. 4, 6-17

McColl KA, Gould AR, Selleck PW, Hooper PT, Westbury HA, Smith JS. Polymerase chain reaction and other laboratory techniques in the diagnosis of long incubation rabies in Australia. Aust Vet J 1993; 70:84-9

Milián, S.F 1998 La epidemiología molecular: Generalidades. Memorias: Introducción a la biología molecular aplicada a la medicina veterinaria. CENID-MICROBIOLOGÍA Palo Alto, México, D.F.

Mohanthy S.B., Dutta S.K. 1993 Virología veterinaria. Interamericana. México, D.F. pp. 238 - 244

Montaño, H.J.A. y Mata, V.A.E. Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. Ciencias Vet., Vol 7. TALLERES EDITORIALES DE LA UNAM. México, D.F., 1996, pp. 67 – 102

Orciari L.A., J.S. Smith, S.G. Whitfield, M. Niezgodá, M., Fekadu, C. Rupprecht 1999 Methodos for extraction from formalina fixed tissues. In 10 th International meeting on reserch advances and rabies control in the Americas. San Diego, C.A. pp.120

Reyna G.J.R., Aguilar S.A., Vargas G.R., Montaña H. J.A. 2000. Caracterización molecular del virus de la rabia en la fauna domestica y silvestre Mexicana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autonoma de México. México D.F. pp. 18 – 21.

Runnels R.A. 1982 Principios de patología veterinaria, anatomía patológica 1ª edición. Editorial Continental. México. pp. 1131.

Sacramento D., Bourhy H. y Tordo N. 1991 PCR technique as an alternative meted for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. Mol. Cell. Probes.

Tordo N., and Badrane H. 1995. Molecualr Epidemiology of wild isolates of Lyssaviruses Practical Course. Institut Pasteur. Paris . pp. 15 – 22.

Wunner W.H. 1991. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In G. M. Baer (Ed.), The Natural History of Rabies. (pp. 31-67). Boca Raton, FL: CRC Press.