



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA LIBRE DE RNA RIBOSOMAL (rRNA) DE LA MICROBIOTA RUMINAL PARA LA GENERACIÓN DE UN META- TRANSCRIPTOMA POR RNA-seq

MIGUEL GUTIÉRREZ FIDENCIO

T E S I S

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO
2018**

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Miguel Gutiérrez Fidencio, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA LIBRE DE RNA RIBOSOMAL (rRNA) DE LA MICROBIOTA RUMINAL PARA LA GENERACIÓN DE UN META-TRANSCRIPTOMA POR RNA-SEQ

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 03 de Septiembre de 2018

Firma del
Alumno (a)

Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Establecimiento de un protocolo de extracción y purificación de RNA libre de RNA ribosomal (rRNA) de la microbiota ruminal para la generación de un meta-transcriptoma por RNA-Seq.** Fue realizada por el alumno: **MIGUEL GUTIÉRREZ FIDENCIO**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, y ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

DIRECTOR
DE TESIS

Dr. Alfredo Sánchez Villarreal

ASESOR

Dr. Sergio Segundo González Muñoz

ASESOR

Dra. Mónica Ramírez Mella

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2018

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA LIBRE DE RNA RIBOSOMAL (rRNA) DE LA MICROBIOTA RUMINAL PARA LA GENERACIÓN DE UN META-TRANSCRIPTOMA POR RNA-seq.

Miguel Gutiérrez Fidencio, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Los microorganismos ruminales se han estudiado principalmente con métodos de cuantificación microscópica o con la microscopía electrónica. Hoy en día las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa, digital y digital por gotitas (PCR, qPCR, dPCR, ddPCR respectivamente) han sustituido los métodos de identificación y caracterización de poblaciones microbianas complejas. Mediante la generación de meta-transcriptomas se puede conocer la actividad metabólica aún de microorganismos incultivables. La generación de meta-transcriptomas requiere de RNA de alta calidad y, a la fecha, los meta-transcriptomas de muestras ruminales se realizan con RNA total; sin embargo, por la naturaleza misma de este ácido nucleico, el RNA ribosomal (rRNA) representa el mayor porcentaje del RNA total y solo una mínima parte corresponde a los transcritos. En consecuencia, se reduce la proporción de las secuencias relacionadas con la actividad transcripcional del meta-transcriptoma con la secuenciación de fragmentos ajenos a mRNA. Este contexto presenta dos grandes desafíos, la estandarización del proceso de obtención de RNA y reducir al máximo el porcentaje de rRNA del RNA total. A pesar de que se ha logrado la eliminación rRNA de muestras complejas de diversos ambientes con kits comerciales, aún se desconoce si estos kits serían efectivos en una muestra de origen ruminal porque implica obtener transcritos de microorganismos eucarióticos y procarióticos simultáneamente.

El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de extracción y purificación de RNA libre de RNA ribosomal con la calidad suficiente para la generación de un metatranscriptoma de la microbiota del rumen. Se colectó líquido ruminal de cuatro borregos machos adultos de la raza Dorset de 80 ± 3 kg de peso vivo alimentados con dos tipos de dietas: alta en forraje (70%) y alta en concentrado (70%), utilizando un diseño experimental "Cross-over", durante cuatro días, en dos horarios posprandial diferentes cada uno. La extracción de RNA de las muestras de líquido ruminal se realizó de manera individual (una muestra por cada borrego y horario) y en "pool" (juntando las 8 muestras de cada hora por cada borrego). La lisis celular se realizó en un disruptor celular (Bead Bug, Benchmark Scientific) con 0.2 g perlas de vidrio (0.1 g de 0.1 mm y 0.5 mm de diámetro, respectivamente). La extracción de RNA se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen) en las muestras individuales siguiendo el protocolo del fabricante; mientras que en las extracciones de los "pools" se realizó una segunda extracción con cloroformo. En el RNA total

extraído se determinó la concentración e integridad mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. En las muestras de RNA total íntegras se realizó un segundo “pool” correspondiente a las dietas concentrado (C) y forraje (F) obteniendo 2 en total. Éstas se procesaron con el kit Ribo-Zero (RZ) de Illumina para la remoción del rRNA, basado en perlas magnéticas y sondas específicas para la selección del rRNA eucariótico y procariótico. Estas muestras libres de rRNA se purificaron y concentraron con el kit RNA Clean and Concentrator (Zymo Research) y después se cuantificaron por espectrometría. Al final se realizó la síntesis del DNA complementario (cDNA) con la enzima retrotranscriptasa (iScript Select, BIO-RAD), y se cuantificó el producto para determinar la cantidad total de producto obtenido.

El protocolo propuesto en esta investigación para la extracción de RNA es eficiente, rápido y permite obtener RNA en cantidad y calidad suficiente para el proceso de purificación indistintamente a la procedencia de la muestra. La purificación del RNA total con el kit Ribo-Zero, redujo eficientemente el rRNA de las muestras y con base en el rendimiento final obtenido de RNA libre de rRNA, se deduce que el método es eficiente, el producto obtenido puede ser utilizado en la generación de un meta-transcriptoma y la síntesis de cDNA no se vio afectada por la reducción del rRNA.

Palabras clave: Herramientas moleculares, microbiología ruminal, ddPCR, qPCR, 16S rRNA, 18S rRNA.

ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR RNA EXTRACTION AND
PURIFICATION FREE FROM RIBOSOMAL RNA (rRNA) FROM THE RUMINAL
MICROBIOTA FOR THE GENERATION OF A META-TRANSCRIPTOME BY
RNA-seq.

Miguel Gutiérrez Fidencio, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Ruminal microorganisms have been studied mainly by microscopic quantification methods or electron microscopy. Nowadays molecular techniques such as the Polymerase Chain Reaction (PCR), quantitative PCR (qPCR) and digital PCR (ddPCR) have replaced the methods of identification, quantification and characterization of complex microbial populations. Through the generation of meta-transcriptomes, the metabolic activity of uncultured microorganisms can be assessed. The generation of meta-transcriptomes requires high-quality RNA and, to date, most of the meta-transcriptomes derived from ruminal microbiota were performed with total RNA. Thus, due to the nature of this nucleic acid, ribosomal RNA (rRNA) represents most of the total RNA and therefore only a small part corresponds to transcribed regions. Consequently, the proportion of sequences related to the transcriptional activity of the meta-transcriptome is reduced with the sequencing of non-mRNA fragments. This context presents two major challenges, the standardization of the process of obtaining RNA and reducing to the maximum the percentage of rRNA of the total RNA. Although the rRNA elimination of complex samples from different environments has been achieved with commercial kits, it is still unknown if these kits would be effective in a sample of ruminal origin because it implies obtaining simultaneously transcripts both from eukaryotic and prokaryotic microorganisms.

The objective of this research was to establish a protocol for extraction and purification of RNA free of ribosomal RNA with sufficient quality for the generation of a meta-transcriptome of the rumen microbiota. Ruminal fluid was collected from four adult male Dorset lambs of 80 ± 3 kg of live weight fed with two types of diets: high in forage (70%) and high in concentrate (70%), using an experimental design "Cross-over", for four days, in two different postprandial schedules for each animal. The extraction of RNA from the ruminal fluid samples was carried out individually (one sample per sheep and schedule) and in pools (8 samples were collected in the term of the 4 days of experiment for each lamb). Cell lysis was performed in a cellular disruptor (Bead Bug, Benchmark Scientific) with 0.2 g glass beads (0.1 g 0.1 mm and 0.5 mm diameter, respectively). RNA extraction was carried out with TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's protocol for the individual samples; whereas for the RNA extractions in pools, a second extraction with chloroform was carried out. In the total RNA extracted, the concentration and integrity were determined by spectrophotometry and electrophoresis in a 1.2% agarose gel. Once the quality of the RNA was assessed, the samples were pooled by the type of diet, thus resulting in 2 pools, one for the concentrate (C) and the other for forage (F). Both RNA were processed with the Ribo-Zero Epidemiology kit (RZ) from Illumina for the removal of rRNA, which is based on magnetic beads and specific probes for the

selection of eukaryotic and prokaryotic rRNA. These rRNA-free samples were purified and concentrated with the RNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research) and then quantified by spectrometry. Finally, the synthesis of complementary DNA (cDNA) with the enzyme retrotranscriptase (iScript Select, BIO-RAD) was performed, and the product was quantified.

The proposed protocol in this thesis for the extraction of RNA from ruminal microbiota is efficient and fast while obtaining RNA in sufficient quantity and quality regardless of the type of diet. The purification of the total RNA with the Ribo-Zero kit, efficiently reduced the rRNA of the samples as deduced from the yield obtained of RNA free of rRNA. This RNA could be used in the generation of a meta-transcriptome as the synthesis of cDNA was not affected by the reduction of rRNA.

Key words: Molecular tools, ruminal microbiology, ddPCR, qPCR, 16S rRNA, 18S rRNA.

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme permitido llegar a este momento de cumplir una meta más en la vida, por darme fortaleza y salud y por mantener siempre a mi lado a mis padres y hermanos como inspiración para seguir preparándome.

A MIS PADRES

Sr. Miguel Gutiérrez Medina y Sra. Juana Fidencio Bautista, por motivarme a seguir preparándome y ser siempre ese motor que mueve mi vida, por ustedes y para ustedes seguiré en busca de más metas. Sé que para ustedes no será posible leer estas líneas, pero, pero es lo que les expreso cada día con mis esfuerzos. ¡¡¡¡Gracias!!!!

A MIS HERMANOS

Celia y Víctor

Por darme ánimos en todo momento, por cuidar a mis padres y por confiar en mi cada vez que emprendo una nueva etapa en mi vida.

A Maribel Cortés Hernández

Por ser el pilar que me impulso a seguir preparándome en lo profesional y para ser mejor como persona. Fuiste, eres y serás siempre lo mejor de en vida.

A mis amistades

Por animarme a seguir adelante, por apoyarme en todo y por brindarme su calidez su mano franca a pesar del tiempo y la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento otorgado para llevar acabo los estudios de posgrado.

Al proyecto **417 “Análisis Transcriptómico de la Microbiota Ruminal de Bovinos Alimentados con Forrajes Tropicales y su Correlación con la Producción de Gases de Efecto Invernadero”** de la convocatoria para Atender Problemas Nacionales de CONACYT 2015 por su financiamiento.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Montecillo** por brindarme la formación académica de mis estudios de posgrado.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Campeche** por brindarme la oportunidad de realizar el análisis de mis muestras en sus laboratorios, especialmente al laboratorio “para extracción de ácidos nucleicos.

Al **Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca** por aceptarme como estudiante de maestría, por apoyarme durante mi formación académica, por su apoyo antes y durante mis estudios de postgrado.

Al **Dr. Alfredo Sánchez Villarreal** por formarme en el área de biología molecular, por dirigir mi tesis y transmitirme su experiencia y conocimientos siempre que lo requerí. Gracias por sus consejos en momentos difíciles y por su paciencia durante mi proceso de aprendizaje.

A la **Dra. Mónica Ramírez Mella** por su asesoría durante el desarrollo del experimento, por estar siempre atenta a mi formación como maestro en ciencias, antes y durante mi estancia en el Campus Campeche y por apoyarme en todo momento en lo profesional y en lo personal.

Al Dr. **Sergio Segundo González Muñoz** por aceptar ser parte de mi consejo particular en mis estudios de maestría que sin duda marcarán una etapa en mi formación profesional.

A la **Dra. María Magdalena Crosby Galván** por ser pieza clave en esta trayectoria, por haberme aceptado en residencia profesional y brindarme su confianza, ya que fue el comienzo y pieza clave de mi formación en el área científica, Gracias doctora por apoyarme y preocuparse por mí en lo académico y en lo personal.

A los doctores **Fulgencio Alatorre Cobos** y **Jaime Bautista Ortega** del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, por su asesoría y apoyo técnico en momentos difíciles durante mi estancia en el campus.

A mis amigos y compañeros en especial a **Yesenia Ángeles Mayorga** por estar conmigo todo este tiempo en momentos buenos y no tan buenos, a pesar de que nuestra etapa llega a su final, quizá pronto volvamos a coincidir en este mundo tan dinámico de la ciencia.

"Se pierde la virginidad de la fe para adquirir la paternidad de la razón"

Nicolás Salmerón.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
GLOSARIO.....	xvi
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo general	2
2.1.1 Objetivos específicos.....	2
III.- HIPÓTESIS	3
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Los rumiantes.....	4
4.1.1 -El rumen.....	5
4.2 Microbiota ruminal.....	6
4.2.1 Microorganismos procariotas en el rumen.....	6
4.2.1.1 Bacterias	6
4.2.1.2 Arqueas	7
4.2.2 Microorganismos eucariotas en el rumen.....	8
4.2.2.1 Protozoarios	¡Error! Marcador no definido.
4.2.2.2 Hongos.....	9
4.3. Grupos funcionales de microorganismos ruminales.....	10
4.3.1 Microorganismos proteolíticos.....	10
4.3.2 Microorganismos celulolíticos.....	10
4.3.3 Microorganismos hemicelulolíticos.....	11
4.3.4 Microorganismos pectinolíticos.....	12
4.3.5 Microorganismos amilolíticos.....	12
4.3.6 Microorganismos ureolíticos.....	13
4.3.7 Microorganismos lipolíticos.....	13

4.4 Microorganismos metanógenos.	14
4.5 Relación protozoario - metanógenos.....	15
V HERRAMIENTAS MOLECULARES Y GENÓMICAS PARA EL ANÁLISIS DE COMUNIDADES MICROBIANAS COMPLEJAS.....	16
5.1 Métodos moleculares para la identificación de microorganismos.....	16
5.2 Los ácidos nucleicos: DNA y RNA.....	17
5.2.1 Tipos de RNA	17
5.2.2.1 RNA mensajero (mRNA)	17
5.2.2.2 RNA de transferencia (tRNA)	18
5.2.2.3 RNA ribosomal (rRNA)	19
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
5.3.1 Componentes y etapas de la PCR.	20
5.4 Tipos de PCR.	21
5.4.1 PCR.....	21
5.4.2 PCR tiempo real	22
6.3.3 PCR digital; PCR digital en gotas (dPCR; ddPCR).	23
6.4 Identificación molecular mediante amplificación de los genes 16S y 18S.	25
6.5 Transcriptoma.	25
6.6 Metatranscriptoma de poblaciones microbianas complejas.	26
6.7 Metatranscriptomas de microorganismos ruminales.	27
6.8 Implicaciones en la extracción de RNA total	28
6.9 Enriquecimiento de transcritos mediante eliminación de rRNA.	29
VII Materiales y métodos.....	31
7.1 Ubicación.....	33
7.2 Borregos y manejo	33
7.3 Tratamientos.	34
7.3.1 Caracterización de las dietas	34
7.3.2 Procedimiento experimental.	36
Los periodos experimentales fueron dos (I y II) y cada uno duró 20 d, con dos grupos de dos borregos en un diseño experimental de Cross-over (cruzado). 36	
7.3.3 Horarios de recolección de LR.	36

7.4 Recolección y conservación de líquido ruminal.....	37
7.5 Inactivación de RNAsa.	38
7.6 Extracción de RNA.	39
7.7 Determinación de la calidad del RNA total.	40
7.7.1 Cuantificación de RNA por espectrofotometría	40
7.7.2 Determinación de la integridad del RNA total por electroforesis.	41
7.8 Purificación de RNA.	41
7.8.1 Purificación de RNA con el kitRibo-Zero Epidemiology de Illumina.....	41
7.9 Purificación y concentración de RNA libre de rRNA por columna.	43
7.10 Síntesis de cDNA	44
VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
8.1. Resultados.	45
8.1.1 Extracción de RNA total (concentración).....	45
8.1.2. Uso de moléculas fluorescentes para visualización de RNA total.	47
8.1.3. Eliminación del rRNA.....	48
8.1.4. Síntesis de cDNA.	49
8.2 Discusiones.	49
8.2.1. Rendimiento y pureza del rRNA de muestras individuales.....	49
8.2.3 Uso de moléculas fluorescentes amigables con el medio ambiente para la visualización del RNA.....	53
8.2.4 Eliminación de rRNA	54
8.2.5 Síntesis de cDNA	54
IX CONCLUSIONES	56
X. PERSPECTIVAS	58
XI. LITERATURA CITADA.....	59
XII APÉNDICE.....	73

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Conformación de las dietas. C (70 %-30 % de concentrado y forraje) y dieta F (30 %-70 % forraje y concentrado) y su composición nutricional.....	35
Cuadro 2. Distribución de horarios postprandial para el muestreo de líquido ruminal.	36
Cuadro 3. Concentración, pureza y rendimiento de RNA extraído de manera individual.	45
Cuadro 4. Concentración, pureza y rendimiento de RNA extraído de las muestras en pool	46
Cuadro 5. Rendimientos de RNA libre de rRNA.	48
Cuadro 6. Concentración y pureza del cDNA de “pool”.	49
Cuadro 7. Rendimiento y pureza de RNA total extraído de muestras individuales.	50
Cuadro 8. Rendimiento y pureza de RNA de protocolos propuestos por (Kang <i>et al.</i> , 2009; Béra-Maillet <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2011).	50
Cuadro 9. Rendimiento y pureza de RNA total extraído en “pool” con el protocolo propuesto.	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** RNA total de las muestras de líquido ruminal individuales y en pool.
Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%..... 46
- Figura 2.** RNA total de las muestras extraídas en “pool” en una electroforesis
empleando como fluoróforo y colorante de carga el U-view..... 47
- Figura 3.** RNA total de las muestras extraídas en “pool” en una electroforesis
utilizando Syber Safe como fluoróforo y loading buffer Dye DNA 6X
como colorante de carga..... 48

GLOSARIO

5.8S, 16S, 18S, 23S, 28S	(S) unidades de Svedberg. El número hace alusión a la subunidad del RNA
AGVs	Ácidos Grasos Volátiles
A^{λ}	(A) Absorbancia
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
Cq	Ciclos de cuantificación
ddPCR	PCR digital por gotas.
DEPC	Dietilpirocarbonato
ddH ₂ O	Agua di-destilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dPCR	PCR digital
EE	Extracto etéreo
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
GEI	Gases de efecto invernadero
H ₂	Hidrógeno
ITS	Del inglés Internal Transcribed Spacer
LR	Líquido ruminal
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Materia seca
NH ₃	Amoniaco
NRC	Del inglés National Research Council
PC	Proteína cruda

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa del inglés (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	PCR cuantitativa
RNAsa	Nucleasa degradadora de RNA
RNA-Seq	Secuenciación de RNA
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT	Retro-Transcripción
SNP	Del inglés Single Nucleotide Polymorphism
TAE	Tris-acetico-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UV	Ultravioleta

I.- INTRODUCCIÓN

Los cambios en la alimentación de los rumiantes alteran las poblaciones microbianas ruminales y en consecuencia impactan en el desempeño productivo del rumiante (Ishaq *et al.*, 2017). El estudio de las comunidades microbianas ruminales se ha realizado mediante métodos de aislamiento microbiológico y recuento por microscopía óptica. No obstante, el estudio de la microbiota ruminal era limitada debido a que la mayoría de los microorganismos ruminales son anaerobios estrictos, tienen necesidades de cultivo desconocidas y en consecuencia son incultivables (Madigan *et al.*, 2015). El estudio de comunidades microbianas complejas se realiza mediante la secuenciación de DNA o RNA. En la secuenciación de RNA el análisis de los transcritos totales de los genes expresados bajo una condición dada en un conjunto de organismos distintos entre sí permite obtener un meta-transcriptoma. A través de estudios meta-transcriptómicos de la microbiota ruminal se ha caracterizado la composición y función del microbioma del rumiante con la finalidad de elucidar la relación entre la microbiota ruminal activa y la eficiencia alimenticia del animal (Li and Guan, 2017); así como el análisis relativo de las poblaciones de bacterias, protozoarios, hongos y arqueas del rumen (Elekwachi *et al.*, 2017). A la fecha los meta-transcriptomas de líquido ruminal (LR) se han realizado a partir de RNA total, lo cual implica la obtención de una cantidad abundante de secuencias correspondientes al RNA ribosomal (rRNA), reduciendo drásticamente la cobertura del mensajero (mRNA), que es el RNA de interés para estos estudios (Poretzky *et al.*, 2005). Por lo tanto, la capacidad de aislar y estabilizar muestras de RNA es muy importante en la obtención de resultados fieles y confiables con estos procedimientos moleculares (Wang *et al.*, 2011). Para maximizar la obtención del mRNA se requiere de protocolos que disminuyan al máximo la presencia del rRNA bacteriano (16S y 23S) y eucariótico (18S y 28S). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es proponer un protocolo de extracción de RNA total estandarizado que funcione indistintamente de la dieta u origen de la muestra; así como la subsecuente eliminación de rRNA para emplearlo como molécula molde en la realización de un meta-transcriptoma.

II.- OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general

Establecimiento de un protocolo de extracción y purificación de RNA libre de RNA ribosomal (rRNA) de la microbiota ruminal para la generación de un meta-transcriptoma mediante RNA-Seq.

2.1.1 Objetivos específicos.

- Proponer y establecer un protocolo de extracción de RNA total a partir de muestras de contenido ruminal de ovinos para obtener RNA total de alta calidad y en cantidad suficiente para su purificación posterior.
- Eliminación del RNA ribosomal mediante un kit de selección sustractiva para los rRNA 16S 18S.

III.- HIPÓTESIS

Mediante la generación de un protocolo para la extracción y purificación de RNA total a partir de muestras de contenido ruminal será posible establecer un método para obtención de RNA libre de rRNA para la realización de estudios transcriptómicos y meta-transcriptómicos de la microbiota ruminal.

IV.- REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Los rumiantes.

Los rumiantes son animales que por su naturaleza digestiva regurgitan el alimento ingerido. La clasificación taxonómica es dos subórdenes: *Tylopoda*, y *Ruminantia*, en este último se encuentra la familia Bovidae (Cobos y Shimada, 2015), la cual incluye a las subfamilias Bovinae y Caprinae, mismas que son consideradas las de mayor importancia zootécnica (Wilson y DeeAnn, 2005).

La importancia de los rumiantes radica principalmente en que son una fuente muy importante para la alimentación humana ya que históricamente se ha obtenido de ellos productos como carne y leche, además de emplearse como animales de tiro o con un valor religioso y de estatus (Hofmann, 1989). Sin embargo, la producción de rumiantes, por la naturaleza misma de su fisiología, es una fuente de gases de efecto invernadero (Henderson *et al.*, 2015), por lo cual se ha acrecentado el interés científico por estudiar al rumiante, su fisiología digestiva y el ambiente ruminal con mayor precisión.

Los rumiantes son animales herbívoros caracterizados por el tipo de digestión y porque no pueden producir las enzimas necesarias para degradar polisacáridos complejos, como la celulosa y hemicelulosa de los forrajes fibrosos que componen su dieta por si mismos (Relling y Mattioli, 2003). En su evolución los rumiantes desarrollaron la conformación de su estómago en cuatro compartimentos: rumen, retículo (retículo-rumen), omaso y abomaso (Relling y Mattioli, 2003; Cobos y Shimada, 2015). Estas características anatómicas y en especial el rumen por su

microbiota, permitieron al rumiante adaptarse a distintos hábitats y a diversas fuentes forrajeras para su alimentación y supervivencia. (Cheng *et al.*, 1991).

4.1.1 -El rumen

El rumen realiza movimientos contráctiles que facilitan la mezcla del alimento ingerido con el líquido ruminal y la colonización de las partículas de alimento por los microorganismos del rumen. Otra función es facilitar el eructo para la expulsión de gases como metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) producidos por los microorganismos durante la fermentación de los alimentos y la regurgitación (Relling y Mattioli, 2003). La regurgitación permite que las partículas grandes del alimento sean reensalivadas, remasticadas y redeglutidas en el proceso de rumia antes de ser fermentadas por la microbiota del rumen (Cobos y Shimada, 2015; Relling y Mattioli, 2003).

El rumen alberga diversos microorganismos responsables de la bioconversión de nutrientes que son una fuente de energía para los rumiantes (Das y Qin, 2012). Estos microorganismos comparten características como ser anaerobios estrictos y por lo tanto no sobreviven cuando se exponen al oxígeno. Las condiciones ambientales normales del rumen para el desarrollo de los microorganismos son un potencial de óxido-reducción (redox) de 250 - 450 milivoltios (Yokoyama y Johnson, 1988), un potencial de hidrógeno (pH) de 5.5 a 7.0 (Krause y Oetzel, 2006), una presión osmótica de 280 mOsM (Church, 1974; Owens y Goetsch, 1988; Castro- Montoya *et al.* 2011) y una temperatura de 39 – 40 °C (Church, 1974; Relling y Mattioli, 2003). Además, ciertos sustratos y nutrientes

proporcionados en la dieta favorecen las condiciones idóneas para el desarrollo de comunidades microbianas complejas (Cheng *et al.*, 1991). Esta microbiota ruminal puede degradar los hidratos de carbono estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) haciéndolos asimilables para el rumiante (Cheng *et al.*, 1991).

4.2 Microbiota ruminal.

El consorcio microbiano en el rumen está integrado por bacterias, arqueas, protozoarios y hongos (Hobson y Stewart, 1997). Los microorganismos del rumen fermentan el alimento formando como subproductos ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales son las principales fuentes de energía para el animal huésped y, por lo tanto, contribuyen significativamente a la productividad de los rumiantes (Hofmann, 1989). Además del alimento ingerido, el rumiante aprovecha a los microorganismos como fuente de proteína al ser digeridos en el abomaso e intestino delgado (Asplund, 1994).

Las poblaciones microbianas son alteradas por diversos factores como la especie y la edad de los hospederos, el tipo de alimentación o el uso de aditivos o ambos. Inclusive la población de arqueas y bacterias son afectadas por la región geográfica (Singh *et al.*, 2012).

4.2.1 Microorganismos procariotas en el rumen.

4.2.1.1 Bacterias

Las bacterias son organismos procariotas, son el dominio más abundante y dominante del rumen y, por lo tanto, hacen la mayor aportación a la digestión y

conversión de alimentos a AGV y además son fuente de proteína (Hobson y Stewart, 1997). Estos microorganismos se pueden detectar en el rumiante desde los 2 a 4 días postnacimiento (Cobos y Shimada, 2015). En rumiantes adultos la concentración de bacterias se estima en 1×10^{10} a 1×10^{12} bacterias por mL líquido ruminal (Mackie *et al.*, 2000). Mediante técnicas de aislamiento e identificación microbiológicas convencionales se han identificado cerca de 30 géneros y hasta 200 especies (McSweeney *et al.*, 2005).

Por su distribución dentro del rumen, las bacterias dentro del rumen se clasifican en cuatro subgrupos.

1) Bacterias asociadas a líquidos. Normalmente son planctónicas, están separadas de las partículas de alimento y consumen alimento soluble (McAllister *et al.*, 1994).

2) Bacterias asociadas al epitelio del rumen. Representan sólo el 1 % de la población bacteriana total del rumen (Czerkawski, 1986); sin embargo, éstas son las bacterias más diversificadas comparadas con las otras poblaciones presentes (Malmuthuge *et al.*, 2012).

3) Bacterias asociadas a eucariotas. Son bacterias adheridas a la superficie de protozoarios en relación simbiótica o a esporangios fúngicos (Miron *et al.*, 2001).

4) Bacterias asociadas a sólidos. Conformado por bacterias adheridas a partículas de alimento, representan hasta el 75 % de la población bacteriana ruminal y se consideran las de mayor importancia por su actividad en la digestión de los alimentos (Koike *et al.*, 2003).

4.2.1.2 Arqueas

La mayor parte de las arqueas ruminales son metanógenas y pertenecen al filo Euryarchaeota. En el rumen, los metanógenos representan menos del 1% de la población microbiana total y mantienen una relación sinérgica con las bacterias y una relación simbiótica con los protozoarios (Wright y Klieve, 2011). El filo Euryarchaeota es el más estudiado en el rumen ya que comprende el grupo más grande de los metanógenos dentro del rumen (Paul *et al.*, 2012).

Las arqueas metanogénicas del rumen utilizan el dióxido de carbono (CO₂) y el hidrógeno (H₂) producido por otros microorganismos en el proceso de fermentación, para producir metano (CH₄), un potente gas de efecto invernadero (GEI) que está implicado en el calentamiento global (Janssen y Kirs, 2008). Se considera que este gas contribuye de manera significativa a las emisiones por actividades antropogénicas globales de GEI (Ripple *et al.*, 2014). Además, la formación de este metano en el rumen representa una pérdida del 2-12% de la energía de alimentación para el rumiante (Johnson y Ward, 1996).

4.2.2 Microorganismos eucariotas en el rumen

4.2.2.1 Protozoarios

Actualmente se conocen cuatro clases de protozoarios con base en su locomoción: Rhizopoda por pseudópodos, Sporozoa sin motilidad, Ciliophora mediante cilios, y Mastigophora por medio de flagelos. De éstos solo los flagelados y los ciliados habitan el rumen y se han identificado cerca de 30 géneros y 300 especies. Los protozoarios se alimentan principalmente de bacterias y según la especie pueden consumir de 700 a 16,000 bacterias por hora, además de consumir

protozoarios de menor tamaño. En el rumen los protozoarios representan hasta el 50 % de la biomasa total de microorganismos (Newbold *et al.*, 2015),

Ciliados. Incluye dos órdenes: Trichostomatida y Entodinomorfida, esta última es la más abundante y está conformada por protozoarios de la familia Ophryoscolecoadae: *Entodiniinae*, *Diplodiniinae*, *Epidiniinae*, *Opisthotrichinae* y *Ophryoscolecinae*. La concentración es 1×10^4 a 10^6 células por mL de líquido ruminal (Cobos y Shimada, 2015). Su tamaño va desde 15 a 250 micras (Dehority, 2004).

Flagelados. Estos protozoarios no están tan estudiados, y los géneros detectados en el rumen son: *Tritrichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas*, *Chilomastix*, *Monocercomonoides* y *Monocercomonas*. Su concentración es similar a las de los ciliados, 1×10^4 a 10^6 protozoarios por mL de líquido ruminal con un tamaño desde 4 a 12 micras. Estos microorganismos no poseen macronúcleo y se alimentan de bacterias por medio de fagocitosis (Cobos y Shimada, 2015).

4.2.2.2 Hongos.

Los hongos anaerobios son microorganismos que habitan el rumen y empiezan a colonizarlo desde los 8 a 10 d de vida del rumiante y están en una concentración menor a 1×10^4 zoosporas por mL de líquido ruminal. Estos organismos producen una amplia gama de enzimas incluyendo celulasas, xilanasas, manasas, esterases, glucosidasas y glucanasas que les permiten penetrar en las paredes de células vegetales de los forrajes, liberan zoosporas que se unen a los fragmentos de células vegetales donde se enquistan y después germinan para producir un talo compuesto de rizoides y el esporangio, y colaborar en la degradación mecánica de la digesta (Puniya *et al.*, 2013).

Hay cinco géneros en el rumen: *Anaeromyces*, *Caecomices*, *Neocallimastix*, *Orpiromyces* y *Piromyces* (Callaghan *et al.*, 2015), de los cuales el género *Neocallimastix* es el más estudiado y hay cuatro especies: *Neocallimastix. frontalis*, *N. hurleyensis*, *N. joyonii* y *N. patriciarum*. Estos microorganismos representan menos del 8 % de la masa microbiana del rumen. Su principal función es la degradación por hidrólisis de carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa de los alimentos fibrosos (Cobos y Shimada, 2015).

4.3. Grupos funcionales de microorganismos ruminales.

4.3.1 Microorganismos proteolíticos.

Las bacterias ruminales que pueden degradar proteínas pertenecen a las siguientes especies en el rumen: *Bacteroides amylophilus*, *B. ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, y *Streptococcus bovis*. Sin embargo, también degradan otros nutrientes contenidos en la digesta (Cobos y Shimada, 2015). Los productos finales de su metabolismo son los AGVs y el amoníaco (Relling y Mattioli, 2003).

4.3.2 Microorganismos celulolíticos.

En el rumen, las bacterias y hongos participan en la degradación de la celulosa de los alimentos fibrosos. El intervalo óptimo de pH para su crecimiento celular es entre 6 y 7. Las principales especies bacterianas celulolíticas en el rumen son: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Clostridium celulosolvens* (Jalaludin *et al.*, 1992; Cobos y Shimada, 2015). Estas bacterias están recubiertas con un glicocálix extracelular,

que les ayuda a adherirse a la celulosa. El producto final del metabolismo de estos microorganismos son los AGVs, en especial el ácido acético (Relling y Mattioli, 2003).

El género *Neocallimastix. frontalis* aumenta su capacidad celulolítica al encontrarse en asociación con metanógenos como *Methanobrevibacter smithii*, desde 16 % a 98 % la degradación de este sustrato en estudios con co-cultivos de estas dos especies (Cobos y Shimada, 2015).

Los protozoarios también tienen actividad celulolítica en el rumen, pero se ha comprobado que esa capacidad es mínima y no representa cambios importantes en la digestión de la celulosa (Cobos y Shimada, 2015).

4.3.3 Microorganismos hemicelulolíticos.

La hemicelulosa es un carbohidrato estructural de la pared celular y representa una cantidad significativa en la cantidad total de polisacáridos de los forrajes que consume el rumiante. Esta hemicelulosa es degradada por los microorganismos ruminales principalmente por algunas especies de bacterias y hongos anaeróbicos (Cobos y Shimada, 2015).

Las bacterias predominantes que contribuyen en la actividad hemicelulolítica en el rumen son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* (Dehority, 2003). El producto final del metabolismo de la hemicelulosa de estas bacterias son AGVs, en especial ácido acético (Relling y Mattioli, 2003).

Los hongos contribuyen en la digestión de los alimentos fibrosos enzimáticamente con las hemicelulasas y de manera mecánica, permitiendo la disponibilidad de estos nutrientes para otros microorganismos (Cobos y Shimada, 2015).

4.3.4 Microorganismos pectinolíticos.

La pectina es el tercer carbohidrato estructural más importante de los forrajes y en el rumen es fermentado más rápido que la celulosa y la hemicelulosa. Las pectinas son ricas en ácido galacturónico. Esta molécula al poseer carga otorga a las pectinas una solubilidad que las hace casi completamente digestibles (Relling y Mattioli, 2003). Las principales especies bacterianas que fermentan este polisacárido en el rumen son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Treponema bryantii* y *Spirocheata spp* (Zhou *et al.*, 2013; Cobos y Shimada, 2015). Estas bacterias producen ácido acético como producto final del metabolismo de la pectina (Relling y Mattioli, 2003).

4.3.5 Microorganismos amilolíticos.

En dietas altas en grano es necesaria la actividad de las bacterias amilolíticas que fermenten el almidón mediante el rompimiento de los enlaces glucosídicos. Esta actividad en el rumen la realizan principalmente las siguientes especies: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes*, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinimonas amyolytica* y *Selenomonas ruminantium*

(Zhou *et al.*, 2013). En general, las bacterias amilolíticas producen AGVs, principalmente ácido propiónico (Relling y Mattioli, 2003). Sin embargo, en condiciones con altos niveles de almidón en el rumen se favorece la proliferación de la especie *Streptococcus bovis*, la cual fermenta el almidón rápidamente y genera ácido láctico como producto final y en consecuencia hay una acidosis láctica en el rumiante (Dehority, 2003).

Los protozoarios también pueden degradar pequeñas partículas de almidón al fermentar la glucosa contenida en el almidón y producen acetato, butirato, glicerol, CO₂ e H₂ (Cobos y Shimada, 2015).

4.3.6 Microorganismos ureolíticos.

Estas bacterias adquieren gran importancia ya que hidrolizan la urea en la dieta de los rumiantes y producen CO₂ y NH₃, este último es aprovechado por los microorganismos para sintetizar sus aminoácidos (Relling y Mattioli, 2003). Las principales bacterias que tienen capacidad ureolítica en el rumen son: *Prevotella ruminicola*, *Butirivibrio spp*, *Selenomonas sp.* y *Succinivibrio dextrinosolvens* (Cobos y Shimada, 2015).

4.3.7 Microorganismos lipolíticos.

Las bacterias ruminales encargadas de la degradación de los lípidos de la dieta son *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrvibrio fibrisolvens*, *Eubacterium limosum*, *Micrococcus spp* y *Treponema bryantii*. (Cobos y Shimada, 2015). Estas bacterias

producen ácidos grasos libres y AGVs, especialmente propionato, como producto final del metabolismo de las grasas (Relling y Mattioli, 2003).

4.4 Microorganismos metanógenos.

Los principales organismos metanógenos en el rumen están clasificados en tres órdenes: Methanobacteriales, Methanomicrobiales y Methanosarcinales (Puniya *et al.*, 2013).

El orden Methanobacteriales predomina en el ambiente ruminal (St-Pierre y Wright, 2012), tiene las familias Methanothermaceae y Methanobacteriaceae, el género *Methanothermus* corresponde a Methanothermaceae, y los géneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* y *Methanothermobacter* pertenecen a la familia Methanobacteriaceae, éstos son los más abundantes y estudiados en el rumen (Puniya *et al.*, 2013). El género *Methanobrevibacter* es el más abundante en el medio ruminal (Wright *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011; St-Pierre y Wright, 2012) e incluye a las especies: *Mbr. smithii*, *Mbr. gottschalkii*, *Mbr. thaueri*, *Mbr. ruminantium*, *Mbr. olleyae*, *Mbr. millerae*, *Mbr. wolinii*, *Mbr. woesei*, y *Mbr. arboriphilus* (Puniya *et al.*, 2013).

El género *Methanobacterium* es menos abundante que el género *Methanobrevibacter* en el rumen y está conformado por *M. aarhusense*, *M. alcaliphilum*, *M. bryantii*, y *M. formicicum* (Janssen y Kirs, 2008; St-Pierre *et al.*, 2012).

El orden Methanomicrobiales lo conforman cuatro familias: Methanoregulaceae, Methanospirillaceae, Methanocorpusculaceae y

Methanomicrobiaceae. De estos sólo Methanospirillaceae y Methanomicrobiaceae se han identificado en el rumen (Singh *et al.*, 2010). Methanospirillaceae y Methanomicrobiaceae se diferencian de los demás metanógenos por tener glicoproteínas en lugar de pseudomurinas en sus paredes celulares (Ferry y Kastead, 2007). Aunque Methanomicrobiaceae no es la familia más metanógena en el rumen, se han identificado las especies *Methanomicrobium móvil* y *Methanoculleus olentangyi* en muestras ruminales (Wright *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

El orden Methanosarcinales está integrado por las familias Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae, esta última incluye dos especies *Methanosarcina barkeri* y *Methanosarcina mazei* que son las únicas identificadas en muestras ruminales. (Hook *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010).

4.5 Relación protozario - metanógenos.

Algunos metanógenos están asociados con los protozoarios, específicamente con los ciliados. Los protozoarios ciliados, contribuyen a la metanogénesis mediante la transferencia de H₂ a los metanógenos. Los protozoarios se benefician de la eliminación de hidrógeno que realizan las arqueas, puesto que este hidrógeno acumulado causaría un efecto inhibitorio sobre su metabolismo. Las arqueas usan el H₂ para reducir el CO₂ a CH₄ (Paul *et al.*, 2012).

V HERRAMIENTAS MOLECULARES Y GENÓMICAS PARA EL ANÁLISIS DE COMUNIDADES MICROBIANAS COMPLEJAS.

5.1 Métodos moleculares para la identificación de microorganismos.

Los métodos de identificación de microorganismos se clasifican en microbiológicos, bioquímicos y moleculares. Los métodos moleculares comprenden técnicas basadas en el análisis y diferenciación de DNA y RNA de las células microbianas, sin la necesidad de que éstas se deben cultivadas (Spiegelman, Whissell and Greer, 2005).

La microbiota ruminal se estudia mediante cuantificación por microscopia óptica de organismos ruminales cultivados en laboratorio, pero las condiciones anaeróbicas de cultivo dificultan el estudio de la mayoría de estos microorganismos (Madigan *et al.*, 2015). Los métodos moleculares basados en ácidos nucleicos son muy sensibles y permiten un alto grado de especificidad. Además, el ácido nucleico obtenido puede ser clonado, secuenciado o amplificarse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitiendo inclusive la obtención de información de comunidades microbianas complejas (Spiegelman, Whissell and Greer, 2005). Por lo tanto, la detección y cuantificación de microorganismos basadas en ácidos nucleicos para el gen 16S y 18S en procariotas y eucariotas respectivamente, ha sustituido a los métodos convencionales utilizados anteriormente (Madigan. *et al.*, 2015).

5.2 Los ácidos nucleicos: DNA y RNA

Los ácidos nucleicos son el DNA y el RNA; son las moléculas que gobiernan el funcionamiento celular y están constituidos por polímeros lineales de nucleótidos purinas (adenina, guanina) y pirimidinas (citosina, timina y uracilo) (Lodish *et al.*, 2016).

El DNA es un biopolímero bicatenario formado por las bases adenina, guanina, citosina y timina. Esta molécula en su secuencia contiene la información para sintetizar todas las proteínas requeridas por la célula y es la fuente de información genética en todas las formas de vida conocidas, excepto en los virus de RNA. Puede llegar a tener un tamaño de hasta 1×10^9 nucleótidos. La información almacenada en el DNA se distribuye en unidades de herencia conocidas como genes y controlan los rasgos identificables para cada organismo. La información del DNA es transcrita al RNA (Lodish *et al.*, 2016).

El RNA es un biopolímero monocatenario formada por adenina, guanina, citosina y uracilo, con varias funciones como la de portar y expresar la información genética, así como una función catalítica. Existen tres tipos principales de RNA: los mensajeros, los ribosomales y los de transferencia (Nelson y Cox, 2000).

5.2.1 Tipos de RNA

5.2.2.1 RNA mensajero (mRNA)

El RNA mensajero, también llamado transcrito, es una secuencia monocatenaria de nucleótidos que transporta la información de los genes contenidos en la molécula de DNA en forma de codones o tripletes de bases que

corresponden específicamente a un aminoácido (Mishra 2018). Este únicamente comprende alrededor del 5 % del total del RNA contenido en las células y es el tipo de RNA más heterogéneo, ya que varía en sus regiones codificantes. El mRNA fue descubierto en 1960 por Sydney Brenner, François Jacob y Matthew Meselson investigadores del Instituto de Tecnología de California (Ullmann 2011).

Esta molécula generalmente tiene una longitud de 300 - 50,000 nucleótidos y varía entre organismos procariontas y eucariotas. Este mRNA se sintetiza en el núcleo de células eucariotas, pero en procariontas su síntesis se realiza directamente en el citoplasma de la célula porque estas células no poseen un núcleo definido.

El mRNA de varios procariontas y bacteriófagos es policistrónico, mientras que el de eucariotas es de naturaleza monocistrónica (Mishra, 2018). Estructuralmente, esta molécula está conformada por Cap, una región no codificante, un codón de iniciación y una región codificadora. En organismos eucariotas el mRNA posee una cola poli-A conformada por aproximadamente 30 adeninas la cual facilita el transporte hacia el citoplasma, promueve la traducción y protege de la degradación por acción de nucleasas. En cambio, en procariontas este segmento de poli-A está ausente (Shabalina *et al.*, 2006). Esto ocasiona diferencias en la vida útil del mRNA, puesto que en células bacterianas los mRNA pueden sobrevivir de segundos a más de una hora; en cambio el mRNA de células de mamífero sobrevive intervalos de tiempo desde varios minutos a días (Mishra, 2018).

5.2.2.2 RNA de transferencia (tRNA)

Los tRNA son moléculas adaptadoras que participan en la traducción del mRNA a proteína al acoplarse con fidelidad a cada codón mediante un anticodón,

el cual corresponde a un aminoácido específico. Este tRNA transporta los aminoácidos al ribosoma donde éstos son incorporados a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis de las proteínas (Nelson y Cox, 2000). Estructuralmente estos RNA tienen estructura secundaria con forma de bucles, está conformado por aproximadamente 70 a 90 nucleótidos y ocupan el 15% del RNA total (Nelson y Cox, 2000).

5.2.2.3 RNA ribosomal (rRNA)

El RNA ribosomal (rRNA) es la molécula principal que conforma a los ribosomas y por lo tanto son la forma más abundante de RNA al tener una función estructural y catalítica, constituyendo aproximadamente del 95 al 98% del total de RNA (Benes, Blake and Doyle, 2011; Peano *et al.*, 2013).

En los ribosomas de organismos eucarióticos están presentes cuatro moléculas de rRNA: 18S conforma la subunidad menor y el 5.8S, 28S y 5S la subunidad mayor. En los organismos procariontes la subunidad menor del ribosoma contiene una molécula única denominada rRNA 16S, mientras que la subunidad mayor contiene una molécula de 23S rRNA y otra 5S rRNA (Ramakrishnan y Moore, 2001)

El gen que codifica para el rRNA es el gen más conservado en todas las células. Por tal motivo, los genes que codifican para el rRNA (rDNA) son utilizados para la identificación taxonómica de organismos, principalmente los espaciadores transcritos internos (ITS del inglés Internal Transcribed Spacer). Éstos corresponden a secuencias de DNA que separan los genes que codifican para los rRNA 28S, 5.8S y 18S en eucariotas y, por lo tanto, su grado de conservación es

menor al grado que pueden ser específicos por especie (Długosz y Wiśniewski, 2006).

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) fue descrita y utilizada por primera vez por Saiki *et al.* (1985). Con la PCR puede amplificarse cualquier secuencia de ácido nucleico presente en una muestra mediante la repetición de un determinado número de ciclos que genera un gran número de copias idénticas que luego se pueden analizar (Spiegelman *et al.*, 2005; Kubista *et al.*, 2006). En ecología microbiana del rumen, la técnica de PCR se ha utilizado para demostrar la diversidad de taxas de microorganismos aún no cultivados, como los hongos anaerobios (Edwards *et al.*, 2017), protozoarios ciliados (Newbold *et al.*, 2015), bacterias y arqueas (Li and Guan, 2017).

5.3.1 Componentes y etapas de la PCR.

La PCR se puede considerar como la replicación *in vitro* del DNA. Esta técnica utiliza una muestra de DNA de doble cadena de la cual se quiere amplificar un fragmento mediante una enzima DNA-polimerasa resistente a la temperatura (originalmente procedente de *Thermus aquaticus* (*Taq*)) capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde, cofactores de la polimerasa como cationes divalentes normalmente en forma de cloruro de magnesio (MgCl₂), los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfo), y un par de oligonucleótidos de 15 a 27 nucleótidos,

específicos del gen o de la secuencia de interés (Madigan. *et al.*, 2015; Lodish *et al.*, 2016).

El ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, hibridación y elongación. El inicio es con la desnaturalización que se realiza por calor a 95 °C y el DNA de doble cadena se separa en hebras simples. La segunda etapa es la hibridación y consiste en una disminución de la temperatura que oscila de 50 a 65 °C, lo cual permite que los oligonucleótidos sintéticos se unan de manera complementaria y específica a los extremos 3' del DNA de interés en la hebra de DNA sencilla. La fase final es la elongación o extensión donde la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios desde el extremo 3' libre de la región en que han hibridado los oligonucleótidos sintéticos. La temperatura esta fase depende de la DNA polimerasa utilizada; si se usa *Taq* polimerasa la temperatura de elongación empleada normalmente es 72 °C (Lodish *et al.*, 2016).

5.4 Tipos de PCR.

5.4.1 PCR

La PCR es una técnica que genera un gran número de copias de un fragmento de DNA como producto final a través de sus repetidos ciclos de amplificación (Kubista *et al.*, 2006). Sin embargo, como técnica analítica, el método de PCR original tiene algunas limitaciones o desventajas en el amplificado de las secuencias de DNA y el análisis del producto, ya que la cuantificación es extremadamente difícil debido a que la PCR da lugar a la misma cantidad de producto, independiente de la cantidad inicial de moléculas patrón de DNA

presentes en una muestra (Kubista *et al.*, 2006). Para superar estas limitaciones actualmente hay otros métodos derivados de la PCR, tales como q-PCR y la PCR digital por gotas que proporcionan mayor precisión.

5.4.2 PCR tiempo real

También conocida como PCR cuantitativa o qPCR, es una herramienta de análisis cuantitativo de ácidos nucleicos desarrollada por Higuchi *et al.* (1992), y es un refinamiento de la PCR original desarrollado por Kary Mullis (Kubista *et al.*, 2006). Sus ventajas son la sensibilidad, la velocidad de análisis, la detección en tiempo real del progreso de la reacción y la cuantificación precisa del material examinado de manera simultánea (Gachon *et al.*, 2004; Kubista *et al.*, 2006).

Ésta técnica se caracteriza por la cuantificación de la amplificación del DNA en tiempo real y controlada durante la reacción mediante la detección de fluorescencia (Holland *et al.*, 1991; Higuchi *et al.*, 1992; Kubista *et al.*, 2006), ya que esta fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicones de DNA generado y se registra al término de cada ciclo o en un momento específico (Kralik and Ricchi, 2017). Los usos típicos de la PCR en tiempo real son diversos: el análisis de expresión génica, la detección de patógenos, el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y la detección de proteínas mediante inmuno PCR en tiempo real (Kubista *et al.*, 2006). Esta técnica es de gran utilidad principalmente en las áreas de diagnóstico clínico, veterinario y en la onovuidad de los alimentos, así como en la identificación de microorganismos (Kralik and Ricchi, 2017). Pero este método tiene la desventaja de carecer de precisión con cantidades muy pequeñas de DNA

molde (Kralik and Ricchi, 2017). Además, para la cuantificación en qPCR se necesita una curva estándar con concentraciones conocidas del DNA objetivo para transformar los valores de salida de qPCR, los ciclos de cuantificación (Cq), en valores de concentración reales (copias objetivo μL^{-1}) (Cankar *et al.*, 2006). Ante esta situación, se han desarrollado adecuaciones que mejoran la eficiencia del proceso en cuanto a la limitante de precisión y a la cantidad inicial de la muestra, y esta técnica se denomina PCR digital dPCR o por gotas (ddPCR).

5.4.3 PCR digital; PCR digital en gotas (dPCR; ddPCR).

La PCR digital tiene como principio fundamental, al igual que otros métodos basados en PCR, incluida la PCR cuantitativa (qPCR), la amplificación específica de los ácidos nucleicos y tiene el potencial de mejorar las limitaciones de la qPCR (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015). La característica que distingue a la dPCR es la separación de la mezcla de reacción en miles y millones de particiones y una detección posterior en tiempo real o punto final de la amplificación (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015). La distribución de las secuencias objetivo en las particiones se describe mediante la distribución de Poisson, lo cual permite una cuantificación precisa y absoluta de las amplificaciones a partir de la relación de particiones positivas en comparación con el total al final de la reacción (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015). Esta técnica evita la necesidad de utilizar materiales de referencia con concentraciones objetivo conocidas y aumenta la precisión de la cuantificación aún a bajas concentraciones de la molécula blanco en comparación con qPCR, en la cual la limitante radica en la cantidad inicial del DNA inicial (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015).

En esta técnica al dividir la mezcla de reacción en millones de particiones (también llamadas gotitas), por probabilidad una fracción de estas particiones está ocupada por una a pocas copias del DNA objetivo y otra fracción de gotas permanece libre del DNA blanco. Así, al término de la amplificación se cuantifican los compartimentos o gotas positivas y negativas, y se obtiene la concentración absoluta de las copias objetivo en la muestra inicial sin la necesidad de ningún estándar (Dube *et al.*, 2008). En dPCR, el número de positivos y negativos se cuantifica al terminar la amplificación por PCR y, por lo tanto, el resultado final es independiente de las variaciones en la eficiencia de amplificación por PCR y, por lo tanto, este método es más preciso, repetible y menos propenso a variaciones (Huggett *et al.*, 2013), además de ser más resistente a inhibidores de la reacción de PCR (Morisset *et al* 2013; Rački *et al* 2014).

Existen instrumentos y equipos disponibles, como Fluidigm Corporation, que ofrece una compartimentalización basada en chips de microfluidos que da como resultado cientos o miles de compartimentos; sin embargo, a la fecha Bio-Rad (Hercules, CA) y RainDance (Lexington, MA) ofrecen tecnología en la cual la compartimentación está basada en emulsiones que pueden generar desde decenas de miles y hasta millones de gotas con sistemas como el QX100 y QX200 ambos de Bio-Rad y el RainDrop® System de RainDance. Esta tecnología ha contribuido a mejores resultados en la investigación principalmente de patología en plantas. (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2015). Otra aplicación de esta tecnología es la cuantificación de RNA, el cual se puede medir usando una transcripción inversa en un solo paso: ddPCR (RT-ddPCR) (Rački *et al* 2014), además de las aplicaciones que ya se realizan con la qPCR.

5.5 Identificación molecular mediante amplificación de los genes 16S y 18S.

Actualmente la identificación de microorganismos, incluyendo los rumiantes se ha realizado con la técnica de PCR mediante el uso de los genes 16S rRNA para las poblaciones bacterianas (Kang *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017) y de arqueas (Li and Guan, 2017; Neves *et al.*, 2017), mientras que para la identificación de protozoarios ciliados del rumen se han utilizado los genes que codifican para el 18S rRNA (Zhang *et al.*, 2017; Ishaq *et al.*, 2017). De igual manera se realiza la detección y cuantificación de hongos anaeróbicos ruminales con las secuencias parciales e intergénicas del gen que codifica para el 18S rRNA fúngico (Edwards *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Ishaq *et al.*, 2017).

5.6 Transcriptoma.

Un transcriptoma es el análisis de todos los transcritos del genoma de un organismo en un momento determinado y por lo tanto específico de una condición; es decir una fotografía que muestra la expresión de genes metabólicamente activos en una condición fisiológica. Se considera transcriptoma si se trata de un solo individuo o de un grupo de individuos semejantes como grupos bacterianos genéticamente iguales. El transcriptoma describe o refleja la expresión génica activa del organismo en estudio mediante la cuantificación de transcritos para comprender su actividad e inferir metabolismos (Edwards *et al.*, 2017).

Las técnicas transcriptómicas aplicadas a estudios de microbiología del rumen podrían mejorar el conocimiento del microbioma ruminal y

consecuentemente ayudar a la comprensión de la estructura de poblaciones microbianas del rumen, su actividad metabólica y su potencial metabólico (Wallace *et al.*, 2017).

5.7 Metatranscriptoma de poblaciones microbianas complejas.

El metatranscriptoma es la secuenciación y análisis de los transcritos totales de los genes expresados bajo una condición dada en un conjunto de organismos distintos entre sí, o al conjunto de transcriptomas de organismos presentes en una sola muestra en estudio. Los metatranscriptomas se utilizan para dilucidar la función de los microorganismos activos en el medio ambiente, especialmente las comunidades microbianas no cultivables, y de éstas se obtiene un perfil funcional (Aguar-Pulido *et al.*, 2016). Lo anterior mediante el gen 16S rRNA hace posible la exploración de comunidades y ecosistemas heterogéneos en condiciones naturales y experimentales, se genera información de la diversidad y funciones de la vida microbiana, así como la relación entre las comunidades microbianas y su interacción con los estados fisiológicos de los sistemas biológicos relacionados (Elekwachi *et al.*, 2017).

Hay estudios metatranscriptómicos de microorganismos en muestras de saliva y heces de humano (Franzosa *et al.*, 2014); en comunidades microbianas de plantas termófilas generadoras de biogás (Maus *et al.*, 2016, Hassa *et al.*, 2018); en comunidades eucarióticas de suelo (Martin and Walker, 2016); en microorganismos de fuentes hidrotermales (Sogin *et al.*, 2006); en análisis de la fermentación microbiana de proteínas de la leche dietética en ratones (Hugenholtz

et al.,2018); y en comunidades de bacterioplancton marino y de agua dulce (Poretsky *et al.*, 2005).

5.8 Metatranscriptomas de microorganismos ruminales.

Los metatranscriptomas la producción de rumiantes se han realizados para comprender la importancia de la microbiota ruminal en la degradación de los alimentos (Dai *et al.*, 2015; Li and Guan, 2017), las interacciones entre grupos microbianos y para entender la función de estos microorganismos en la formación del CH₄ (Neves *et al.*, 2017). En investigaciones con rumiantes también se han realizado estudios metatranscriptómicos para: la identificación filogenética de arqueas y bacterias (Neves *et al.*, 2017); el análisis filogenético de grupos bacterianos enfocados en bacterias degradadoras de proteína (Kang *et al.*, 2009; la identificación de genes de bacterias relacionados con la degradación de polisacáridos de la pared celular vegetal (Dai *et al.*, 2015); el análisis de la diversidad de los microorganismos eucariotas que degradan la pared celular de las plantas (Qi *et al.*, 2011). Con los estudios metatranscriptómicos de la microbiota ruminal se pretende caracterizar la composición y función del microbioma activo del rumiante (Elekwachi *et al.*, 2017) con la finalidad de elucidar la relación entre la microbiota ruminal activa y la eficiencia alimenticia del rumiante (Li and Guan, 2017).

Los metatranscriptomas de líquido ruminal provienen de muestras de RNA total, lo cual implica la obtención de una cantidad abundante de secuencias de transcritos correspondientes al rRNA y se reduce drásticamente la cobertura del mRNA, que es el RNA de interés de los estudios transcriptómicos (Poretsky *et al.*, 2005). La capacidad de aislar y estabilizar muestras representativas de RNA es muy

importante en la obtención de resultados fieles y confiables con estos procedimientos moleculares (Wang *et al.*, 2011), en particular los transcriptómicos. Por lo tanto, para maximizar la obtención del mRNA se requieren protocolos que disminuyan al máximo la presencia del rRNA bacteriano (16S y 23S) (Stewart *et al.*, 2010) y también el rRNA de eucariontes (18S y 28S).

5.9 Implicaciones en la extracción de RNA total

Los estudios transcriptómicos y metatranscriptómicos se utilizan para dilucidar la función de los microorganismos en distintos ambientes que por su naturaleza resultan difíciles de estudiar. Para lo anterior es importante contar con RNA en cantidad suficiente y de calidad. Uno de los procesos que más influye en la calidad del RNA de muestras es el método de lisis celular. Para muestras de líquido ruminal hay varias maneras de lisar las células: la lisis enzimática, la cual consiste en el rompimiento de la célula con lisozima; la disrupción mecánica mediante “Bead Beating” con la utilización de cantidades pequeñas de perlas de vidrio o zirconio de diámetros inferiores a 1 mm; y la lisis química con el reactivo Trizol o semejantes derivados del tiocianato de guanidino con agitación en vortex (Kang *et al.*, 2009).

En muestras de contenido ruminal, el reactivo Trizol basado en el método de guanidino-fenol-cloroformo (Chomczynski and Sacchi, 2006; Béra-Maillet *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) es el más usado para la lisis celular y extracción del RNA y mantiene esta molécula estable (Elekwachi *et al.*, 2017). Sin embargo, a la fecha no hay consenso para la utilización de un protocolo

estandarizado para la extracción de RNA en cantidad y calidad suficiente para su posterior eliminación del rRNA y empleo en posteriores estudios transcriptómicos.

5.10 Enriquecimiento de transcritos mediante eliminación de rRNA.

Para permitir la detección eficiente de los transcritos, los rRNA generalmente se eliminan del RNA total, ya sea por selección positiva de poliA + o por eliminación de rRNA (selección negativa) antes de la secuenciación (Zhao *et al.*, 2018).

En microorganismos eucariotas el método de selección comúnmente empleado es por poli-A mediante el oligo-dT, el cual selecciona sólo el mRNA. En muestras de líquido ruminal se ha seleccionado por este método el mRNA para la identificación de hongos anaeróbicos y con resultados exitosos al momento de la secuenciación (Wang *et al.*, 2011; Elekwachi *et al.*, 2017). En contraste, la mayoría del mRNA bacteriano no está poliadenilado y, por lo tanto, no puede aislarse usando la selección de oligo-dT como ocurre en organismos eucariotas (Giannoukos *et al.*, 2012). Para el enriquecimiento de RNA no ribosomal, el kit Ribo-zero Gold (Illumina) ha demostrado una eliminación eficiente del rRNA citoplasmático y el rRNA mitocondrial de muestras íntegras y degradadas de células de mamífero (Benes, Blake and Doyle, 2011). También se ha mostrado que es posible enriquecer los perfiles de expresión hasta 40 veces para transcritos que no son rRNA en tres especies bacterianas cultivadas y en muestras de heces de humanos eliminando los rRNA con la utilización de este mismo kit (Giannoukos *et al.*, 2012).

Otros kits de eliminación del rRNA, son: el MICROBExpress (Invitrogen™) y el kit Ovation® (NuGEN) los cuales permitían enriquecer los perfiles de expresión de 10 a 205 veces, respectivamente, en comparación con el RNA total de células

bacterianas, mientras que la utilización combinada de estos dos kits aumenta el enriquecimiento de los transcritos hasta 238 veces (Peano *et al.*, 2013).

En células eucariotas de cerebro de ratón se ha demostrado una mayor detección de transcritos tras la secuenciación por RNA-seq tras la eliminación de rRNA de muestras de RNA total con el kit Ribo-Minus (Invitrogen) reflejado en comparación del método poli-A (Cui *et al.*, 2010).

VI MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales de la etapa experimental y recolección de LR

Animales y manejo.

- **Alimentos:** Los ingredientes de las dietas fueron maíz quebrado, avena acicalada, rastrojo de maíz, melaza, minerales y carbonato de calcio (Unión Tepexpan, estado de México).
- **Material:** Cánula de taygon rígido 4 cm de diámetro, jaulas metálicas de 1.4 m x 1.4 m, comederos metálicos, bebederos con capacidad de 18 L aserrín y viruta.
- **Fármacos:** Desparasitante Ivermectina (Iverful F[®], ARANDA) y vitamina ADE (ADE MAX[®]).
- **Material de asepsia:** Jabón, azul de metileno.

Recolección y conservación de muestras de líquido ruminal.

- Termos con capacidad de ½ galón, vasos de precipitados de 200 mL, recipiente de peltre de 10 L, tela tipo manta de cielo, puntas para micropipetas, micro pipetas de 200 µL a 1000 µL ACROSS PRO (OHAUS), manguera de látex, jeringa de 50 mL, tubo de plástico con base redonda, tubos Corning estériles de 2.0 mL nuevos, bolsas de polipapel, gradillas y conexión "T" de plástico.
- Material químico: Etanol al 80 %, agua destilada, nitrógeno líquido.
- Material biológico: Borregos machos adultos raza Dorset con peso de ~80 kg y líquido ruminal.

- Equipo: parrilla eléctrica, autoclave, ultracongelador 88000 SERIES (Thermo Scientific).

Materiales utilizados en biología molecular: Todos los materiales se esterilizaron por calor húmedo con una autoclave (a 120 °C y 15 lb de presión durante 15 min) o por calor seco con un horno (250 °C durante 12 h).

Tubos microcentrífugo 2ml, 1.5, 0.5 y 0.2 mL (Axygen® o Nest), tubos microcentrífugo con tapa de rosca 2 mL punta plana (CORNING®), tubos microcentrífugo con tapa de rosca y base cónica (ThermoScientific), puntas para micropipeta estériles de 0.01, 0.2 y 1 mL (NEST®), perlas de vidrio (0.5 mm-1 mm) Benchmark scientific, micropipetas ACROSS PRO (OHAUS), frascos con tapa de rosca, guantes de latex y de nitrilo (NEST®).

Reactivos y soluciones utilizados en biología molecular: Todas las soluciones para el trabajo con RNA se trataron con DEPC según Molecular cloning (Sambrook and Russel, D, 2000).

TRIZol (Invitrogen o ThermoFisher), cloroformo (SIGMA-ALDRICH), isopropanol (SIGMA® Life Science), etanol al 75 % y etanol 100 % grado biología molecular (SIGMA), agarosa (NORGEN, BIOTEK CORP), marcador molecular GeneRuler 100 pb Plus DNALadder, ready-to-use (Thermo Scientific), GeneRuler 1 kb Plus DNALadder, ready-to-use (Thermo Scientific), loading buffer Dye DNA 6X, Buffer 1X (TAE, ver apéndice 3) y agua libre de nucleasas, retrotranscriptasa (iScript Select, BIO-RAD), kit RNA Clean and Concentrator (Zymo Research), Ribo-Zero epidemiology (Illumina) y Syber Safe (Invitrogen).

Equipo utilizado en biología molecular: Microcentrífuga refrigerada (Heraeus fresco Thermo Fisher)), disruptor celular (Bead Bug, Benchmark Scientific), vortex (BIO-RAD), balanza analítica (Ohaus), ultracongelador (Revco® Thermo Scientific), espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™), cámaras de electroforesis y fuente de poder (Bio-Rad), fotodocumentador ChemiDoc MP System (Bio-Rad), horno de microondas convencional.

6.1 Ubicación

El experimento se realizó en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Estado de México ubicado geográficamente a 19° 29'27" N, 98° 53' 27" O y una altitud de 2241 msnm. El clima es templado semi seco y con precipitación de 632.5 mm/añual, siendo en el verano el 95% de las lluvias y el otro 5% durante el invierno. La temperatura promedio anual es de 15.2°C (García, 2004). Las extracciones, cuantificación y análisis de ácidos nucleicos, se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional y el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, ubicado en Sihochac, Champotón, a 19° 29'53.27" N y 90° 32' 45.39" O a 19 msnm. Con clima cálido subhúmedo con temperatura media anual de 26°C.

6.2 Borregos y manejo

Los borregos utilizados en este experimento se manejaron y cuidaron con apego a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para animales de experimentación. Se utilizaron cuatro borregos adultos de la raza Dorset, con un peso vivo al inicio del experimento de 80 kg \pm 3.0 kg, con cánula de taygon rígido

de 4 cm de diámetro interior colocada en el saco dorsal del rumen. Antes de iniciar el experimento los borregos se desparasitaron con Ivermectina 1 mL 50 kg PV⁻¹ vía subcutánea) y se les suministró vitaminas ADE (2 mL por animal vía intramuscular). Durante el experimento los animales se alojaron en jaulas individuales de reja metálica de 1.4 m x 1.4 m con cama de paja, ubicadas en el área experimental de jaulas metabólicas del campus Montecillo. Durante el periodo de investigación los borregos tuvieron agua *ad libitum*.

6.3 Tratamientos.

Los borregos se alimentaron con una ración de 1.77 kg d⁻¹. Los tratamientos fueron: una dieta con 70 % de concentrado y otra con 70 % de forraje (avena achicalada, rastrojo de maíz) denominadas dieta C y dieta F, respectivamente. Las dos dietas eran isoproteínicas de acuerdo con los requerimientos sugeridos por NRC (2000) para borregos machos adultos en etapa de mantenimiento.

6.3.1 Caracterización de las dietas

La caracterización nutricional de las dietas evaluadas se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del programa en Ganadería del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo mediante el análisis bromatológico, en el cual se determinó el porcentaje de materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto etéreo (E.E), y cenizas (A.O.A.C, 2005). Además, se determinó el contenido de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest, 1993) (ver apéndice 2) Los ingredientes y la composición nutricional de las dietas se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Conformación de las dietas. **C** (70 %-30 % de concentrado y forraje) y dieta **F** (30 %-70 % forraje y concentrado) y su composición nutricional.

Ingrediente	Dieta C (%)	Dieta F (%)
Maíz quebrado	61	21
Avena achicalada	17	47.5
Rastrojo de maíz	13	22.5
Melaza	6	6
Minerales	2	2
Carbonato de calcio	1	1
Composición nutricional de las dietas	%	%
MS	90.54	91.37
Proteína	6.58*	6.17*
FDN	37.75*	71.47*
FDA	17.65*	32.10*
Cenizas	5.86*	7.47*
E.E	3.60*	2.22*

* Porcentaje de nutrientes en base seca.

6.3.2 Procedimiento experimental.

Los periodos experimentales fueron dos (I y II) y cada uno duró 20 d, con dos grupos de dos borregos en un diseño experimental de Cross-over (cruzado).

En la etapa uno, los borregos del grupo I se alimentaron con la dieta **C**, y el grupo II se alimentó con la dieta **F**, con la siguiente distribución en el tiempo: del día 1 al 5 para la adaptación a las dietas, del día 6 al día 15 para el consumo de las dietas **C** y **F** por sus respectivos grupos, y del día 16 al día 19 para recolectar muestras de líquido ruminal. Del día 20 al día 24 se alimentaron con la misma dieta con -10 % de inclusión ascendente de la segunda dieta en cada alimentación, para ambos tratamientos antes de iniciar la siguiente etapa.

En la etapa dos, se alimentó al grupo I con la dieta **F** y el grupo II con la dieta **C**, con la siguiente distribución: del día 25 al día 34 para el consumo de las dietas, por sus respectivos grupos, y del día 35 al 38 se realizó la recolección de líquido ruminal.

6.3.3 Horarios de recolección de LR.

Los borregos se alimentaron cada día, a las 07:00 y 19:00 h. El muestreo se realizó durante los últimos cuatro días de cada periodo de alimentación. Los horarios de muestreo se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Distribución de horarios postprandial para el muestreo de líquido ruminal.

Día	Hora 1	Hora 2
1	8:00	14:00

2	9:30	15:30
3	11:00	17:00
4	12:30	18:30

6.4 Recolección y conservación de líquido ruminal.

Previo a la recolección del líquido ruminal se limpiaron superficialmente cuatro termos con capacidad de ½ galón y cuatro vasos de precipitados de 200 mL con etanol al 80 % para desinfectarlos de microorganismos presentes. Después se calentaron 2 L de agua destilada en un recipiente limpio usando parrilla eléctrica para acondicionar la temperatura de los termos entre 37-39 °C, similar a la temperatura del rumen. Con calor húmedo se esterilizó la tela tipo manta de cielo y puntas para micro pipeta de 1000 µL en una autoclave a 120°C por 15 min. El borrego se inmovilizó con un bozal para facilitar su manipulación y evitar accidentes. La cánula del borrego con cuidado con agua tibia para evitar contaminación. El tapón de la cánula se retiró y se mantuvo en agua caliente para facilitar su colocación al final del muestreo. Después se desechó el agua de los termos para depositar el líquido ruminal extraído a través de la cánula, por la cual se introdujo la sonda de manguera de látex conectada con una jeringa de 50 mL en un extremo y con un tubo de plástico perforado en el otro extremo, haciendo contacto con la parte líquida del contenido ruminal. Una vez introducida la sonda se succionó con la jeringa desde el otro extremo y otro de los tres extremos se colocó dentro del termo tibio vacío para depositar aproximadamente 100 mL del líquido ruminal. Ya terminada la recolección los termos se taparon herméticamente para evitar la

pérdida de temperatura y la oxigenación de la muestra. Finalmente se lavó la cánula y se colocó el tapón para liberar al borrego muestreado. La muestra de líquido ruminal se trasladó al Laboratorio de Nutrición Animal del Programa en Ganadería del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo para dosificar en tubos microcentrifugos de 1.5 mL y su congelación y almacenamiento a -80°C.

La muestra de contenido ruminal se filtró a través de una tela tipo manta de cielo doblada en cuatro capas para retener partículas de alimento y se recolectó en un vaso de precipitados desinfectado. Después se colocaron 0.8 mL del líquido ruminal muy homogéneo en tubos de rosca de 2.0 mL (Corning), los cuales contenían 0.2 g de perlas de vidrio (Benchmark scientific) de 0.1 mm y 0.5 mm de diámetro, respectivamente, y de inmediato se congelaron en nitrógeno líquido durante 1 min para conservar las células hasta el momento de extracción. Las muestras congeladas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. En total se obtuvieron cinco muestras de 0.8 mL de cada borrego por cada horario de recolecta postprandial.

6.5 Inactivación de RNAsa.

El agua utilizada para las soluciones y buffers se trataron con DEPC al 1 %, se agitó con vigor y después de una noche de reposo se esterilizó 15 min en autoclave a 15 lb (121.5 °C) para inactivar el DEPC.

Toda la cristalería utilizada se esterilizó por calor seco a 250 °C durante 8 h.

6.6 Extracción de RNA.

Las muestras se guardaron durante aproximadamente cuatro meses a 80 °C hasta el momento de extracción de ácidos nucleicos. La extracción de RNA del líquido ruminal se realizó conjuntado en un “pool” las muestras colectadas en los ocho horarios postprandial. La recolección se realizó de esta manera para evitar que los resultados en las poblaciones microbianas estuvieran sesgados por el factor tiempo.

Previo a la descongelación de la muestra, se colocaron 0.2 g de perlas de vidrio estériles (0.1 g de 0.5 mm y 0.1 mm respectivamente) y 850 µL de reactivo TRIzol por cada 400 µL de muestra en un tubo (2 mL) de tapa de rosca estériles de fondo cónico. Las 8 muestras en hielo se descongelaron y se adicionó 500 µL de reactivo TRIzol a cada una y reposaron en hielo durante 5 min. De cada una de las 8 muestras de líquido ruminal descongelada se colocaron 50 µL en 5 tubos con perlas y reactivo TRIzol y se mezcló con vortex. Los tubos con las muestras se colocaron en el disruptor celular Bead Bug (Benchmark Scientific) y se lisaron las células a máxima velocidad (400 rpm) durante 3 min. Las muestras lisadas se colocaron en hielo durante 3 min y reposaron 3 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 0.2 vol de cloroformo frío por cada mL de reactivo TRIzol usado en la lisis celular (~220 µL) y se mezcló vigorosamente con vortex, los tubos se incubaron de 2 a 3 min a temperatura ambiente del laboratorio (25 °C) y se centrifugaron 15 min a 12,000 g a 4 °C y el resultado fue una fase superior incolora, una interfase y una fase inferior orgánica. La fase acuosa se transfirió a un tubo microcentrífugo de 1.5 mL estéril en la cual se realizó una segunda extracción con 0.2 volúmenes de cloroformo frío y la fase acuosa se recolectó de nuevo al final de

la centrifugación. Luego se adicionaron 0.5 volúmenes de isopropanol frío por cada 1 mL de reactivo TRIzol usado en la lisis celular (550 μ L), se mezcló por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente de laboratorio (25 °C). Después se centrifugó 10min a 12,000 g d a 4°C, se decantó el sobrenadante sin perder de vista el precipitado (pastilla con aspecto de gel de color blanquecino a transparente). La pastilla de RNA se lavó con 1000 μ L etanol al 75 %, se centrifugó 10 min a 7,500 g a 4 °C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se secó 5 a 10 min a temperatura ambiente del laboratorio (25 °C). Y se resuspendió en 20 a 50 μ L de agua libre de RNAsas.

6.7 Determinación de la calidad del RNA total.

La calidad de RNA total extraído se determinó mediante cuantificación por espectrofotometría y a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

6.7.1 Cuantificación de RNA por espectrofotometría

La concentración del RNA total extraído de las muestras de líquido ruminal fue cuantificado por espectrofotometría con el equipo NanoDrop 2000. Para medir absorbancia (A) a 260 y 280 nm se utilizó 1.5 μ L del RNA total y se obtuvo la concentración del RNA en $\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ y la relación de A^{260} / A^{280} , la cual indica el grado de pureza entre el RNA.

6.7.2 Determinación de la integridad del RNA total por electroforesis.

Se pesaron 1.44 gramos de agarosa y se mezclaron con 120 mL de buffer TAE 1X para preparar agarosa al 1.2 %, la cual se derritió en un horno de microondas cuidando que no llegara al punto de ebullición. La agarosa derretida se reposó a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura aproximada de 40-45 °C y se adicionaron 12 µL de Syber Safe (Invitrogen) a razón 1:10. Ésta se vertió en un molde nivelado con capacidad para 15 o 20 pozos y se solidificó en 20 min. El gel de agarosa se colocó en la cámara de electroforesis Bio-Rad y se le adicionó el buffer de electroforesis TAE 1X hasta cubrir la totalidad del gel. Se transfirieron 200 ng de cada una de las muestras de RNA y a un tubo microcentrifugo de 0.5 mL nuevo, adicionado previamente con 1 µL de loading buffer Dye DNA 6X y los microlitros correspondientes de agua libre de RNasas para un volumen de 6 µL totales. Las muestras se colocaron en los pozos del gel y se realizó la electroforesis a 75 volts durante 40 minutos. El gel e visualizó con el fotodocumentador ChemiDoc MP System de Bio-Rad empleando transiluminación con luz UV.

6.8 Purificación de RNA.

6.8.1 Purificación de RNA con el kit Ribo-Zero Epidemiology de Illumina

Los componentes del kit Ribo-Zero rRNA se retiraron del almacenamiento (-80 °C) para equilibrar a temperatura ambiente. El método de remoción de rRNA por el método de Ribo-zero se divide en los siguientes procesos:

Preparación de las perlas magnética, Los componentes del kit de perlas magnéticas fueron retirados de las condiciones de almacenamiento bajo

refrigeración (2 °C a 8 °C) para permitir que se equilibren a temperatura ambiente. Homogenizamos las perlas magnéticas vigorosamente con vortex y se colocaron 225 µL de éstas en un tubo libre de RNAsas. Este tubo se colocó con la tapa abierta en un soporte magnético durante al menos 1 minuto hasta que la solución se volvió clara. Con el tubo todavía en el soporte magnético se retiró el sobrenadante. Posteriormente el tubo se retiró del soporte magnético y se agregaron 225 µL de agua libre de RNAsas y se agitó con vortex. Este lavado con agua se repitió una segunda vez tras lo cual el tubo fue colocado nuevamente con la tapa abierta, en el soporte magnético durante 1 min y se descartó el agua restante. Finalmente, el tubo se retiró del soporte magnético y se adicionaron 65 µL de la solución de resuspensión de perlas magnéticas, las cuales previamente se atemperaron a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió con vortex.

Tratamiento del rRNA con la solución de eliminación de rRNA Ribo-Zero.

En este paso, la solución de eliminación de rRNA Ribo-Zero que contiene las sondas se hibridó con la muestra. Para cada muestra se agregaron en tubo para microcentrífuga de 0.2 mL los siguientes componentes: agua, buffer de reacción Ribo-Zero (4 µL), muestra de RNA total desde 500 ng hasta 2.5 µg, solución de remoción (de 8 a 10 µL) para un volumen total de 40 µL. La mezcla se homogenizó completamente pipeteando suavemente de 10 a 15 veces, seguido por una incubación a 68 °C durante 10 minutos. Posterior a la incubación las muestras se centrifugaron brevemente. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos hasta la remoción del rRNA.

Eliminación del rRNA. Se agregaron 40 μL de las muestras de RNA total hibridadas, a un tubo que contenía los 65 μL de las perlas magnéticas lavadas previamente resultando un volumen total de 105 mL. Esta mezcla se homogenizó pipeteando de 10 a 15 veces a temperatura ambiente, se mezcló la muestra durante 10 segundos con vortex a alta velocidad, posteriormente los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos seguido por una Incubación a 50 °C durante 5 minutos. Al terminar la incubación los tubos fueron colocados de inmediato en el soporte magnético al menos 1 minuto hasta que la solución se tornó clara y se recuperó un volumen de 85-90 μl del sobrenadante. Éste contiene el RNA libre de rRNA y se transfirió a un tubo de 1.5 mL para ser purificado y concentrado posteriormente.

6.9 Purificación y concentración de RNA libre de rRNA por columna.

Para la purificación y concentración de las muestras RNA procesadas con el kit Ribo-zero se empleo el kit Clean and Concentrator (Zymo Research) con el siguiente procedimiento:

Se ajustó la muestra a un volumen de 50 μL y agregamos dos volúmenes de RNA Binding Buffer (100 μL), en esta mezcla se agregó un volumen proporcional de etanol absoluto (150 μL) y se homogenizó con vortex. La mezcla fue transferida a la columna con el tubo colector ya colocado y se centrifugó a 13,000 g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Después se agregaron 400 μL de buffer RNA prep a la columna, se centrifugó 1 min a 13,000 g y se descartó el sobrenadante. Luego se adicionaron 700 μL del buffer RNA wash, centrifugando bajo las

condiciones antes descritas desechando el sobrenadante. Otro lavado se realizó con 400 μL de buffer RNA wash y se centrifugó 2 min a 13,000 g. Al terminar la columna se colocó en un tubo nuevo, se agregaron 15 μL de agua libre de RNasas a la matriz de la columna, y reposó 1 min antes de centrifugar a 13, 000 g por 1 min para recuperar el sobrenadante para su uso posterior.

6.10 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó a partir de las muestras purificadas y concentradas previamente procesadas con el kit de eliminación Ribo-zero utilizando los primers al azar con el siguiente procedimiento:

Todos los componentes de la transcripción reversa se descongelaron excepto la enzima transcriptasa reversa, En un tubo para PCR de 0.2 mL se colocó agua libre de RNasas, 4 μL la mezcla de reacción iScript select, 2 μL de primers al azar, la muestra de RNA libre de rRNA de 1 ng a 1 μg volumen variable y 1 μL de la iScript para un volumen total de 20 μL . La mezcla de reacción se agito e incubó se incubo a 25°C durante 5 minutos seguido de otra incubación a 42 °C durante 30 minutos. Finalmente, para desactivar la transcriptasa reversa, la mezcla de reacción se incubó a 85°C durante 5 minutos. Los productos de cDNA se guardaron a -20 °C hasta su uso en las reacciones de dPCR.

VII RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Resultados.

7.1.1 Extracción de RNA total (concentración)

El protocolo establecido en esta investigación se aplicó a muestras de líquido ruminal recolectadas de animales a diferentes horas post alimentación.

La cuantificación del RNA obtenido a partir de 400 μ L de muestras individuales de líquido ruminal de ovinos se presenta en el cuadro 3 y la cuantificación de las muestras de RNA extraídas en pool a partir de 400 μ L con la adición de una segunda ronda de extracción con cloroformo se muestra en el cuadro 4. La integridad del RNA total de las muestras extraídas tanto de manera individual como en “pool” se muestra en la figura 1.

Cuadro 3. Concentración, pureza y rendimiento de RNA extraído de manera individual.

Muestra	ng/ μ L	260/280	260/230	μ g RNA total
II F-B11	547.9	1.93	0.58	38.35
I F-J14	444.4	1.89	0.75	31.11
I C-B9	1009.8	1.98	0.83	60.59
I C-B8	927.25	1.93	0.54	55.64
I F-E8	1832.54	2.03	1.17	109.95
I F-E9	1774.16	2.01	0.83	88.71
I C-B11	1460.67	1.97	0.87	73.03
I F-E11	1572.27	2.00	0.81	78.61

Se muestran la cantidad e indicadores de pureza de los RNA extraídos con el método propuesto en esta tesis. La relación 260/280 y 260/230 denota el resultado de absorción de la muestra a dichas longitudes de onda.

Los números romanos I y II corresponden a las etapas de colecta. Las siglas F y C son para las dietas de forraje y concentrado, respectivamente, mientras que J, E, B corresponden la

identificación del borrego. La numeración arábica corresponde al horario de muestreo postprandial (ver materiales y métodos, 7.3 Tratamientos).

Cuadro 4. Concentración, pureza y rendimiento de RNA extraído de las muestras en pool

Muestra	ng/μL	260/280	260/230	μg RNA total
I C-B	971.94	2.04	1.55	121.49
I C-R	2148.01	1.92	1.33	171.84
II C-J	1532.79	1.93	0.65	183.93
II C-E	957.65	1.96	1.08	57.46
I F-E	1797.53	2.03	1.00	143.80
I F-J	1059.81	2.08	1.16	63.59
II F-R	1630.52	2.06	1.22	171.20
II F-B	1902.84	2.07	1.57	114.17

Se muestran la cantidad e indicadores de pureza de los RNA extraídos con el método propuesto en esta tesis. La relación 260/280 y 260/230 denota el resultado de absorción de la muestra a dichas longitudes de onda. Los números romanos I y II corresponden a las etapas de recolección, Las siglas (F y C a las dietas de forraje y concentrado respectivamente, mientras que J, E, R y B corresponden la identificación del borrego. (Ver materiales y métodos, 7.3 Tratamientos y 7.6 Extracción de RNA).

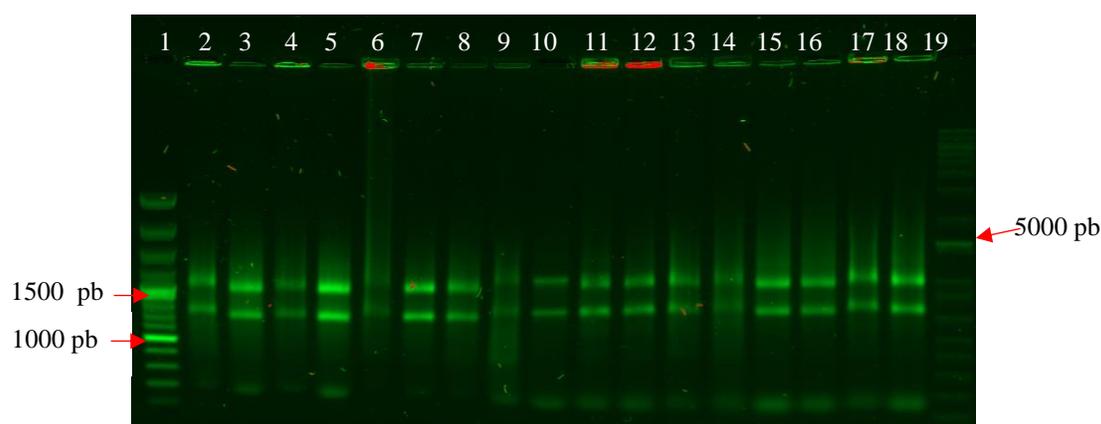


Figura 1. RNA total de las muestras de líquido ruminal individuales y en pool. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carril 1 marcador de 100 pb, carriles 2-9 RNA total de pools 2) I-C-B, 3) II-F-R, 4) I-C-R, 5) I-F-E, 6) II-C-J, 7) I-F-J, 8) II-F-B, (9) II-C-E. Carril 10 RNA control, carriles 11-18 RNA total de muestras individuales 11) II-F-B11, 12) I-F-J14, 13) I-C-

B9, 14) I-C-B8, 15) I-F-E8, 16) I-F-E9, 17) I-C-B11, 18) I-F-E11; carril 19 marcador de 1 KB. Los números romanos I y II corresponden a las etapas de recolección. Las siglas (F y C a las dietas de forraje y concentrado respectivamente, mientras que J, E, R y B corresponden a la identificación del borrego. La numeración arábica corresponde al horario de muestreo postprandial (ver materiales y métodos sección 7.3 Tratamientos).

7.1.2. Uso de moléculas fluorescentes para visualización de RNA total.

Para la visualización de RNA de líquido ruminal se probaron los fluoróforos U-view (Bio-Rad) y Syber Safe (Invitrogen), los cuales son más amigables con el medio ambiente y representan un peligro menor al manejo del bromuro de etidio según la prueba de Ames de acuerdo con los fabricantes. En las figuras 2 y 3 se muestran las imágenes obtenidas después de la electroforesis empleando el U-view y el Syber Safe respectivamente.

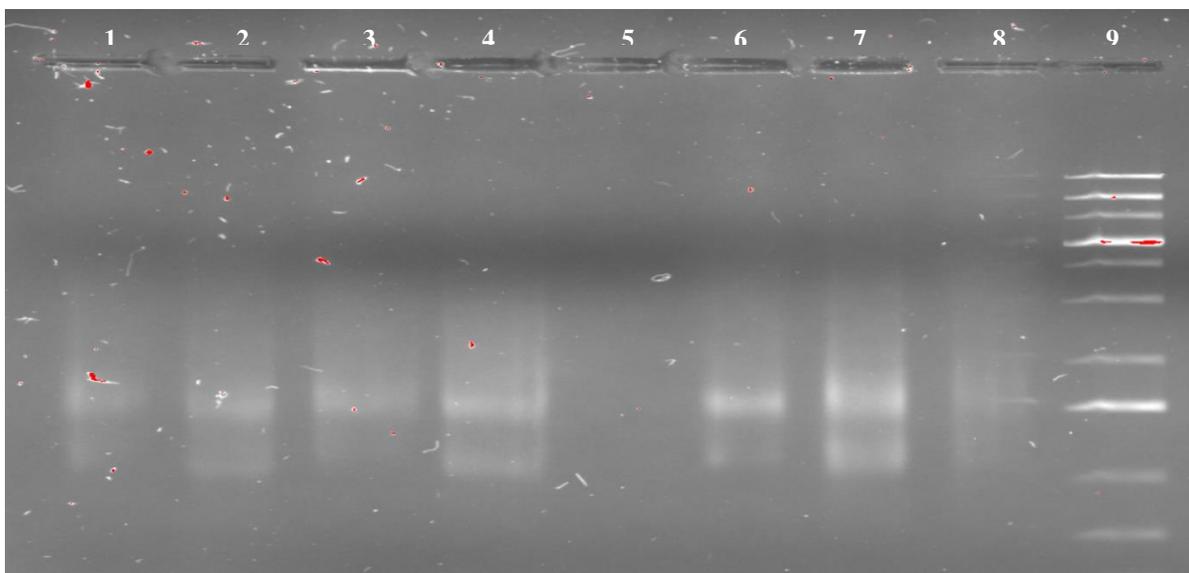


Figura 2. RNA total de las muestras extraídas en “pool” en una electroforesis empleando como fluoróforo y colorante de carga el U-view. Se colocaron cantidades superiores a los 3 μ g de RNA por muestra en un gel de agarosa al 1.2 %. Donde carril 1 (I-C-E), 2 (II-F-R), 3 (I-C-R), 4 (I-F-E), 5 (II C-J), 6 (I F-J), 7 (II F-B), 8 (II C-E) y 9 (1 KB). Las siglas (F y C a las dietas de forraje y concentrado, respectivamente, mientras que J, E, R y B corresponden a la identificación del borrego. La numeración arábica corresponde al horario de muestreo postprandial (ver materiales y métodos sección 7.3 Tratamientos).

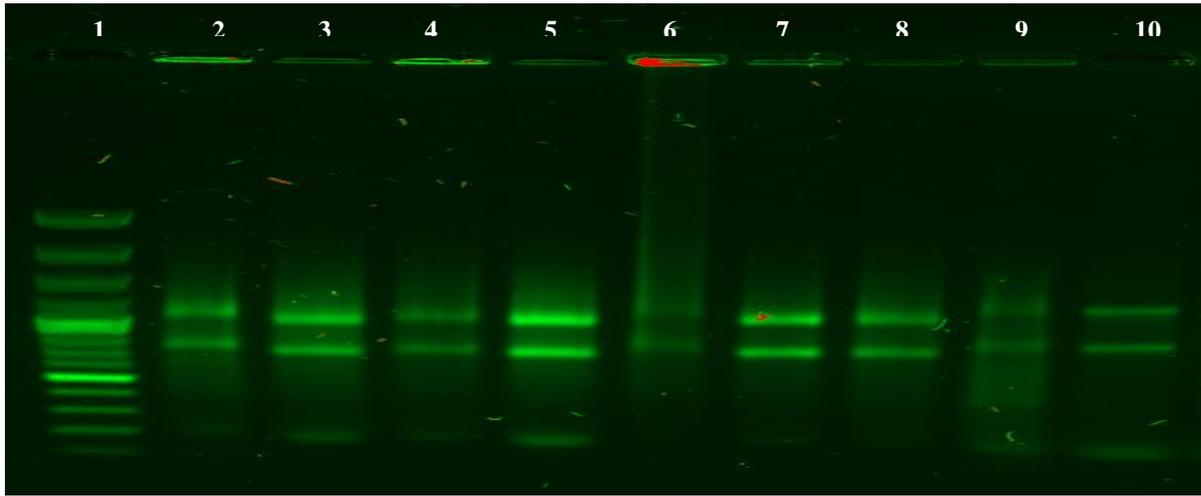


Figura 3. RNA total de las muestras extraídas en “pool” en una electroforesis utilizando Syber Safe como fluoróforo y loading buffer Dye DNA 6X como colorante de carga. Se adicionaron cantidades ~200 ng de RNA por pozo en un gel de agarosa al 1.2 %, Donde carril 1 (1 KB). 2 (IC-E), 3 (IIF-R), 4 (IC-R), 5 (IF-E), 6 (II C-J), 7 (I F-J), 8 (II F-B), 9 (IIC-E) y 10 control positivo. Las siglas F y C son para las dietas de forraje y concentrado, respectivamente, mientras que J, E, R y B corresponden la identificación del borrego. La numeración arábica corresponde al horario de muestreo postprandial (ver materiales y métodos sección 7.3 Tratamientos).

7.1.3. Eliminación del rRNA.

Las muestras de RNA total fueron reducidas en rRNA a partir de 2.5 µg iniciales por reacción, recuperando ~ 20% del RNA inicial después del uso del kit. (Cuadro 3).

Cuadro 5. Rendimientos de RNA libe de rRNA.

Muestra	ng/µL	ng totales
F RZ	34.7	520.5
C RZ	27.5	412.5

Rendimientos (ng) de las muestras de RNA tratadas con el kit Ribo-Zero. Las siglas denotan la dieta (F) dieta forraje, (C) dieta concentrado o el tratamiento (RZ) con Ribo Zero.

7.1.4. Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó desde 200 ng de RNA libre de rRNA. Los resultados de la cuantificación espectrofotométrica tanto de concentración y pureza se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración y pureza del cDNA de “pool”.

Muestra	ng/ μ L-1	260/280	260/230	μ g totales
F RZ	976.16	1.82	2.07	18.3232
C RZ	807.0	1.83	2.12	16.140
F SRZ	1050.36	1.82	2.18	21.0072
C SRZ	1134.92	1.82	2.18	22.6984

Se muestra la relación de $A^{260/280}$ y $A^{230/280}$ de los cDNA obtenidos después de la retro-transcripción tanto de muestras a las que no se les removió el rRNA como las tratadas con el kit Ribo-Zero. Se observa una mayor cantidad de cDNA en las muestras que no fueron tratadas con el kit de remoción. (F) dieta forraje, (C) dieta concentrado, (RZ) tratamiento con kit Ribo.Zero.

7.2 Discusiones.

7.2.1. Rendimiento y pureza del rRNA de muestras individuales.

Los resultados de la extracción de RNA desde 400 μ L de muestras individuales con lisis mecánica y química (protocolo trizol) mostraron rendimientos menores a los 100 μ g en la mayoría de las muestras. Dichos rendimientos fueron desde 31 μ g 0.4^{-1} mL a 109 μ g 0.4^{-1} mL superan a cantidades obtenidas por Wang et al. (2011) que oscilan entre 162 μ g mL^{-1} a 232 μ g mL^{-1} y aun cuando utilizó los

protocolos propuestos por Kang *et al.*, (2009) o Béra-Maillet *et al.* (2009), quienes obtuvieron rendimientos de hasta 39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 163 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LR respectivamente a partir de 1000 μL de muestra de LR (ver cuadro 8).

La relación de lectura de A260/280 en todas las muestras extraídas con lisis mecánica y química mostraron valores dentro del rango de 1.0 a 2.0, que fueron ligeramente superiores a los obtenidos en otros estudios (Kang *et al.*, 2009; Béra-Maillet *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). (Ver cuadro 8). Lo anterior indica que el RNA está libre proteínas que eventualmente se coprecipitan con el ácido nucleico. Una relación de absorbancia A260/280 menores a 1 indicaría que los RNA extraídos de esta manera se ven afectados por compuestos fenólicos propios de la extracción. No obstante, a que las concentraciones de RNA total son altas, éstos mostraron rendimientos totales inferiores a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$ (ver cuadro 7 y 8).

Cuadro 7. Rendimiento y pureza de RNA total extraído de muestras individuales.

Muestra	260/280	260/230	$\mu\text{g RNA total}$
II F-B11	1.93	0.58	38.35
I F-J14	1.89	0.75	31.11
I C-B9	1.98	0.83	60.59
I C-B8	1.93	0.54	55.64
I F-E8	2.03	1.17	109.95
I F-E9	2.01	0.83	88.71
I C-B11	1.97	0.87	73.03
I F-E11	2.00	0.81	78.61

Cuadro 8. Rendimiento y pureza de RNA de protocolos propuestos por (Kang *et al.*, 2009; Béra-Maillet *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

Muestra	260/280	260/230	$\mu\text{g RNA total}$
---------	---------	---------	-------------------------

Método Kang., <i>et al</i> (2009)	1.78 1.89	1.90 1.82	38.0 39.0
Método Béra-Maillet <i>et al.</i> , 2009	1.99 1.86	2.03 1.82	140.0 163.0
Wang <i>et al.</i> , (2011). LRCI – columna	2.02 1.88	1.95 2.06	232.0 201.0
Wang <i>et al.</i> , (2011). LRCI	1.91 2.05	1.89 2.10	182.0 162.0

Modificado de (Wang *et al.*, 2011)

La relación de lectura de A260/280 en las muestras extraídas con el protocolo que incluye lisis celular mecánica y química y una segunda ronda de extracción con cloroformo, propuesto en esta tesis, mostró en valores dentro del rango de 1.0 a 2.0 en todos los RNA obtenidos lo que nos indica que el RNA está libre proteínas que eventualmente se copresipitan con el ácido nucleico. La relación de absorbancia A260/280 superiores a 1, muestra que los RNA extraídos en “pool” con lisis celular y doble extracción con cloroformo, no se ven afectados por compuestos fenólicos propios de la extracción ligeramente superiores a las relaciones de pureza obtenidas por (Kang *et al.*, 2009; Béra-Maillet *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Además las concentraciones de RNA total a partir de 400 μL de muestra de LR son altas y mostraron rendimientos en su mayoría superiores a 100 μg totales en comparación con las concentraciones obtenidas por Wang *et al.* (2011) que oscilan entre 162 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 232 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y aun cuando utilizó los protocolos propuestos por Kang *et al.*, (2009) o Béra-Maillet *et al.* (2009), mismos que obtuvieron rendimientos de hasta 39 $\mu\text{g/mL}$ y 163 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LR respectivamente a partir de 1000 μL de muestra de LR (ver cuadros 8 y 9).

Cuadro 9. Rendimiento y pureza de RNA total extraído en “pool” con el protocolo propuesto.

Muestra	ng/MI	260/280	260/230	µg RNA total
I C-B	971.94	2.04	1.55	121.49
I C-R	2148.01	1.92	1.33	171.84
II C-J	1532.79	1.93	0.65	183.93
II C-E	957.65	1.96	1.08	57.46
I F-E	1797.53	2.03	1.00	143.80
I F-J	1059.81	2.08	1.16	63.59
II F-R	1630.52	2.06	1.22	171.20
II F-B	1902.84	2.07	1.57	114.17

La integridad del RNA total extraído por el método de lisis mecánica y química además del método con una segunda ronda de cloroformo se visualizó mediante el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2 % con aproximadamente 200 ng de muestra de RNA total (ver materiales y métodos sección 7.7.2 Determinación de la integridad del RNA total por electroforesis). En la cual se observan dos bandas de en cada carril, la banda superior ubicada entre 1500 pb y 5000 pb corresponde a las subunidades mayores 26S y 28S del ribosoma de organismos procariotas y eucariotas respectivamente, las bandas inferiores en cada carril, ubicadas entre 1000 pb y 1500 pb representan las subunidades menores 16S y 18S de organismos procariotas y eucariotas respectivamente entre de organismos procariotas y eucariotas respectivamente. No obstante, a que las bandas superiores se aprecian integras, no se distingue la separación entre estas dos subunidades menores y mayores en respectivos casos debido a que la electroforesis se corrió en un gel de agar natural y no en un gel desnaturizante, este último permitiría la separación y

detección de dos bandas correspondientes a estas subunidades menores y mayores dando en total 4 bandas en cada carril (ver figura 1).

En los carriles del 2 al 9 se observan los RNA de las muestras obtenidas en “pool” en donde se observaron en los carriles 6 y 9 barridos en lugar de bandas definidas lo cual indica que esas RNA están degradados sin embargo las del resto de ese grupo de muestras se observa íntegro y una alta intensidad lo cual indica abundancia o alta concentración de RNA total (ver figura 1). Por otra parte, los carriles del 11 al 18 corresponden a las muestras de RNA total obtenidas de manera individual en los cuales no se observaron bandas degradadas, por lo que se interpreta como RNA íntegro en todos los carriles sin embargo pocas intensidades de las bandas indican baja abundancia o concentración de RNA total. En esta electroforesis se comprueba que las muestras de RNA obtenidas en “pool” con dos rondas de extracción con cloroformo, son más abundantes que las obtenidas de manera individual con una sola extracción (ver figura 1).

7.2.3 Uso de moléculas fluorescentes amigables con el medio ambiente para la visualización del RNA.

En la búsqueda de sistemas de marcaje y detección de ácidos nucleicos más amigables con el medio, se optó por moléculas de nueva generación dentro de la denominada “química verde”. Se empleó tanto el U-view como el SYBER Safe, moléculas que también se intercalan entre las bases del DNA y RNA al igual que el bromuro de etidio, pero con menor potencial mutagénico que este último, permitiendo visualizar los ácidos nucleicos con transiluminación UV. Se demostró

que el fluoróforo U-view necesita una mayor cantidad de muestra de RNA (superior a los 3,000 ng) para detectar esta molécula mediante electroforesis en agarosa, ésta no permite visualizar las bandas con la nitidez suficiente para interpretar la integridad de las muestras. Lo cual indica poca sensibilidad con el RNA (figura 2). Lo anterior probablemente se debe a una baja interacción del U-view con ácidos nucleicos de una sola cadena. En cambio, las muestras de RNA visualizadas con la ayuda de la molécula Syber Safe mostraron bandas más definidas con la nitidez suficiente para interpretar la integridad de las muestras con cantidades de alrededor de 200 ng (ver figura 3), con lo cual se demostró que el SYBER Safe tiene una mucho mayor sensibilidad para RNA.

7.2.4 Eliminación de rRNA

En la eliminación del rRNA con el kit Ribo-Zero se observa mayor RNA recuperado en las muestras provenientes de líquido ruminal de borregos alimentados con forraje, lo que puede representar una cantidad mayor microorganismos en las muestras de borregos alimentados con esta dieta. Estos resultados muestran una reducción importante de RNA ribosomal en ambas muestras tratadas lo que indica que el kit de eliminación si funciona en muestras de líquido ruminal eliminado del 79.18 % al 83.5 % del total del RNA mismo que corresponden a los rRNA 16S y 18S.

7.2.5 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando primers al azar debido a que estos hibridan en cualquier parte del RNA sin distinguir ni diferenciar entre transcritos

poliadenilados, no poliadenilados, RNA codificantes y no codificantes entre otros. Los resultados demuestran que el rendimiento en la síntesis de cDNA de las muestras tratadas con el kit Ribo-Zero son menores a los rendimientos obtenidos con las muestras no tratadas con el kit de eliminación, se sugiere que puede deberse a que las muestras tratadas contenían mayor número de secuencias blanco en las cuales hibridaron las primers al azar, mientras que las muestras tratadas ya no contenían un gran número de secuencias blanco, y por lo tanto rendimiento en la hibridación en la síntesis de cDNA fue mayor en las muestras no tratadas en comparación con las reducidas en rRNA. Este resultado similar en ambos tratamientos F y C (ver cuadro 6).

VIII CONCLUSIONES

1. El protocolo propuesto es eficiente, rápido y permite obtener RNA en suficiente cantidad y de buena calidad para su posterior purificación. El protocolo no es afectado por la procedencia de la muestra de líquido ruminal (dieta) ni por el efecto del sujeto (animal), por lo cual es robusto y se podría usar en extracciones de RNA de líquido ruminal en rumiantes pecuarios. La no utilización de columnas con filtro de sílica para la extracción del RNA, reduce los costos de los procedimientos y, por lo tanto, es resulta una alternativa para la investigación en rumiantes pecuarios.

2. La visualización de las muestras de RNA en electroforesis en gel de agarosa con fluoróforo U-view requiere mayor cantidad de RNA, mientras, que Syber Safe bajo las mismas condiciones de electroforesis en gel de agarosa tiene mayor sensibilidad y, por lo tanto, requiere de menos muestra para la visualización del RNA.

3. El proceso de eliminación del rRNA mediante el uso del kit Ribo-Zero, reduce eficientemente el rRNA de las muestras. Con base en el rendimiento final obtenido de RNA libre de rRNA, se deduce que el método es eficiente y el producto obtenido se puede ser utilizado en la generación de un meta-transcriptoma.

4. La reducción del RNA de las muestras no interfirió con una eficiente síntesis de cDNA, esa pequeña diferencia en el rendimiento se sugiere que se debe

a un ligero número mayor de secuencias blanco, pero no a la disminución del rRNA en la muestra.

IX. PERSPECTIVAS

El cDNA obtenido se podrá usar en la caracterización de los microorganismos ruminales implicados en la metanogenesis, y en la degradación de fibras de desechos agrícolas mediante técnicas de PCR, qPCR o ddPCR.

El RNA reducido en rRNA podrá utilizarse para generar un meta-transcriptoma de las poblaciones ruminales, concentrando la cantidad de transcritos y favoreciendo el porcentaje de repetitividad de secuencias de transcritos. Esto permitirá la búsqueda de la eficiencia alimenticia en relación a la producción animal. Así también en el estudio de metabolitos vegetales y su impacto en la disminución de gases de efecto invernadero.

El procedimiento propuesto para la extracción de RNA y la eliminación de los rRNA será aplicable en estudios enfocados a estrategias alimenticias en otros rumiantes favoreciendo la mitigación de gases de efecto invernadero, el aprovechamiento de subproductos agrícolas alternativos entre otras aplicaciones.

X. LITERATURA CITADA

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C). 1975. Official Methods of Analysis of the Association of official agricultural chemists. 12th edition. Published by the association of official agricultural chemists. Washington .D.C.

Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. 2016. Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 12(Suppl 1), 5–16. <http://doi.org/10.4137/EBO.S36436>.

Asplund, John Malcolm (1994). Principles of protein nutrition of ruminants. CRC Press, Boca Raton. <https://trove.nla.gov.au/work/10675078>.

Benes, V., Blake, J. and Doyle, K. 2011. Ribo-Zero Gold Kit: improved RNA-seq results after removal of cytoplasmic and mitochondrial ribosomal RNA. *Nature methods*. *Nature Publishing Group*. 8(11):3-4. doi: 10.1038/nmeth.f.352.

Béra-Maillet, C., Mosoni, P., Kwasiborski, A., Suau, F., Ribot, Y., & Forano, E. 2009. Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.009>

Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S. and Griffi, G. W. 2015. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycKeys*. 9:11–29.

Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6: 37–55.

Castro-Montoya, J. M., Makkar, H. P. S., Becker, K. 2011. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system rumen. *Can J Anim Sci.* 91:433–448.

Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H., and Costerton, J. W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. En: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, San Diego, California, EEUU.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1: 581–585. doi: 10.1038/nprot.2006.83.

Church, D. C. 1974. *Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pág. 632.

Cobos M. A. and Shimada, A. 2015. Digestión y metabolismo ruminal. *Nutrición animal*. Tercera Edición. Editorial TRILLAS, pp. 67-105.

Cui, P., Lin, Q., Ding, F., Xin, C., Gong, W., Zhang, L., Yu, J. 2010. A comparison between ribo-minus RNA-sequencing and polyA-selected RNA-sequencing. *Genomics*, 96(5), 259–265.

Czerkawski, J. W. 1986. An Introduction to Rumen Studies, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt.

Dai, X., Tian, Y., Li, J., Su, X., Wang, X., Zhao, S., Huang, L. (2015). Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in the cow rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1375–1386. <https://doi.org/10.1128/AEM.03682-14>

Das, K. and Qin, W. 2012. Isolation and characterization of superior rumen bacteria of cattle (*Bos taurus*) and potential application in animal feedstuff. *Open Journal of Animal Sciences*. 2: 224-228. doi: 10.4236/ojas.2012.24031.

Dehority, B. A. 2004. Starch digester, other less numerous species, and facultative anaerobes in the rumen. In: Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham. pp. 243–264.

Długosz, E. and Wiśniewski, M. 2006. Molecular diagnostic of parasites using rRNA gene sequence. *Wiad Parazytol.* 52(4): 263-269. PMID: 17432616.

Dube, S., Qin, J. and Ramakrishnan, R. 2008. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One* 3(8): pp. 28-76.

Edwards, J. E., Forster, R. J., Callaghan, T. M., Dollhofer, V., Dagar, S. S., Cheng, Y., Smidt, H. 2017. PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: Insights, challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01657>.

Elekwachi, C. O., Wang, Z., Wu, X., Rabee, A., & Forster, R. J. 2017. Total rRNA-seq analysis gives insight into bacterial, fungal, protozoal and archaeal communities in the rumen using an optimized RNA isolation method. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01814>

Ferry, J. G. and Kstead, K. A. 2007. Methanogenesis. In: Cavicchioli R (ed) *Archaea: molecular and cellular biology*. ASM Press, Washington, DC, pp. 288–314.

Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., Huttenhower, C. 2014. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), E2329–E2338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319284111>

Gachon, C., Mingam, A. and Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot*. 55:1445–1454. doi: 10.1093/jxb/erh181.

García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de köppen. Universidad nacional autónoma de México. Geografía, ed. Quinta edición. Ing. Juan B. Puig. [https://doi.org/ISBN- UNAM: serie de libros \(obra general\)](https://doi.org/ISBN-UNAM:serie%20de%20libros%20(obra%20general)).

Giannoukos, G., Ciulla, D. M., Huang, K., Haas, B. J., Izard, J., Levin, J. Z., ... Gnirke, A. 2012. Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biology*, 13(3), r23. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-r23>

Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Dreo, T. and Ravnikar, M. 2015. Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of Pathogens. In: Lacomme C. (eds) *Plant Pathology. Methods in Molecular Biology*, volumen 1302. Humana Press, New York, NY.

Hassa, J., Maus, I., Off, S., Pühler, A., Scherer, P., Klocke, M., & Schlüter, A. 2018. MINI-REVIEW Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8976-7>

Henderson, G., Cox, F. and Ganesh, S. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*. 5:14567. doi:10.1038/srep14567.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10: 413-417.

Hobson, P. N. and Stewart, C. S. 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, New York. <http://www.bookmetrix.com/detail/book/35531141-dda1-4ce8-89e6>.

Hofmann R. R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78: 443–457.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7276–7280.

Hook, S. E., Wright, A. D. G. and McBride, B. W. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea, Vancouver*. pp 1–11.

Hugenholtz, F., Davids, M., Schwarz, J., Müller, M., Tomé, D., Schaap, P. Kleerebezem, M. 2018. Metatranscriptome analysis of the microbial fermentation of

dietary milk proteins in the murine gut. *PLoS ONE*. 13(4): e0194066.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0194066>.

Huggett, J. F., Foy, C. A. and Benes, V. 2013. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem*. 59: 892–902

Ishaq, S. L., AlZahal, O., Walker, N., & McBride, B. 2017. An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Frontiers in Microbiology*. 8(OCT). doi: 10.3389/fmicb.2017.01943.

Jalaludin, S., Ho, Y. W. and Abdullah, N. 1992. Rumen microorganisms of the water-buffalo. *Buffalo J*. 3: 211-220.

Janssen, P. H. and Kirs, M. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol*. 74(12): 3619–3625.

Johnson, D. E. and Ward, G. M. 1996. Estimates of animal methane emissions. *Environ Monit Assess*. 42(1-2):133-41. doi: 10.1007/BF00394046. PubMed PMID: 24193497. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24193497>.

Kang, S., Denman, S. E., Morrison, M., Yu, Z., and McSweeney, C. S. 2009. An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. *Current Microbiology*. 58(5): 464–471.
<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9345-z>.

King, E. E., Smith, R. P., St-Pierre, B., & Wright, A. D. G. 2011. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and holstein dairy cows under

the same diet regimen. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5682–5687. <https://doi.org/10.1128/AEM.05130-11>

Koike, S., Yoshitani, S. and Kobayashi, Y. 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 229: 23-30.

Kralik, P. and Ricchi, M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology* 8: 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.

Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126: 215-236.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K. Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine.* 27(2–3): 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

Kumar S, Dagar SS, Puniya AK (2011) Isolation and characterization of methanogens from rumen of Murrah buffalo. *Ann Microbiol.* 62(1): 345–350.

Li, F. and Guan, L. L. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology.* 83(9): 1–16. doi: 10.1128/AEM.00061-17.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Brestcher, A., Ploegh, H., Amon, A. y Scott, M. P. 2016. Biología celular y molecular. Séptima edición. Editorial Medica Panamericana. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 1220 p.

Mackie, R. I., Aminov, R. I. and White, B. A. 2000. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. In: Cronjé PB (ed) Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. CAB International, London, pp. 61–77.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K.S., Buckley, D. H. and Stahl, D. A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1136 P.

Malmuthuge, N., Li, M. J. and Chen, Y. H. 2012. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiol Ecol.* 79: 337-347.

Martin, F. and Walker, J. M. 2016. Microbial Environmental Genomics IN Series Editor. doi: 10.1007/978-1-4939-3369-3.

Maus, I., Koeck, D. E., Cibis, K. G., Hahnke, S., Kim, Y. S., Langer, T., Klocke, M. 2016. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0581-3>

McAllister TA, Bae HD, Jones GA. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 72:3004–3018.

McSweeney, C. S., Blackall, L. L. and Collins, E. 2005. Enrichment, isolation and characterisation of ruminal bacteria that degrade non-protein amino acids from the tropical legume *Acacia angustissima*. *Anim Feed Sci Technol.* 121:191-204.

Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrison, M. 2001. Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci.* 84: 1294-1309.

Mishra, A. 2018. Messenger RNA. In: Vonk J., Shackelford T. (eds) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham.

Morisset, D., Štebih, D. Milavec, M. 2013. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One.* 8:e62583.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. Third Edition. Worth Publishers. Pp 1162

Neves, A. L. A., Li, F., Ghoshal, B., McAllister, T., & Guan, L. L 2017. Enhancing the resolution of rumen microbial classification from metatranscriptomic data using Kraken and Mothur. *Frontiers in Microbiology.* 8: 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2017.02445.

Newbold, C. J., De la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology.* 6: 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.01313.

Owens, F. N. y A. L. Goetsch. 1988. Fermentación ruminal. En: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. C. D. Church (Ed.). Editorial Acribia, S. A.

Paul, K., Nonoh, J. O. and Mikulski, L. 2012. Methanoplasmatales” thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol.* 78(23): 8245-8253.

Peano, C., Pietrelli, A., Consolandi, C., Rossi, E., Petiti, L., Tagliabue, L., Landini, P. 2013. An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria. *Microbial Informatics and Experimentation*. 3(1): 1. doi: 10.1186/2042-5783-3-1.

Poretsky, R. S., Bano, N., Buchan, A., LeClerc, G., Kleikemper, J., Pickering, M., Hollibaugh, J. T. 2005. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(7): 4121-4126. doi: 10.1128/AEM.71.7.4121.

Puniya, A. K., Singh, R., and Kamra, D. N. 2013. From Evolution to Revolution. Springer. Retrieved from <http://internetofthingsagenda.techtarget.com/podcast/From-evolution-to-revolution-with-the-Internet-of-Things>

Qi, M. et al. 2011. Snapshot of the eukaryotic gene expression in muskoxen rumen- A metatranscriptomic approach. *PLoS ONE*. 6(5). doi: 10.1371/journal.pone.0020521.

Rački, N., Morisset, D. and Gutierrez-Aguirre, I. 2014. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Anal Bioanal Chem*. 406: 661-667.

Ramakrishnan, V., & Moore, P. B. 2001. Atomic structures at last: The ribosome in 2000. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), 144–154. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00184-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00184-6)

Relling, A. E., G. Mattioli. 2003. Fisiologia digestiva y metabolica de los rumiantes. Editorial EDULP.

Ripple, W. J., Smith, P., Haberl, H., Montzka, S. A., McAlpine, C., & Boucher, D. H. 2014. Ruminants, climate change and climate policy. *Nature Climate Change*, 4(1), 2–5. <https://doi.org/10.1038/nclimate2081>.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354.

Sambrook, J., & Russel, D, W. (2000). *Molecular Cloning, 3-Volume Set: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harboc Laboratory Press. <https://doi.org/10.1002/abio.370050118>

Shabalina, S. A., Ogurtsov, A. Y., and Spiridonov, N. A. 2006. A periodic pattern of mRNA secondary struc- ture created by the genetic code. *Nucleic Acids Research*, 34(8): 2428-2437.

Singh, K. M., Pandya, P. R. Parnerkar, S. 2010. Methanogenic diversity studies within the rumen of Surti buffaloes based on methyl coenzyme M Reductase A (mcrA) genes point to Methanobacteriales. *Pol J Microbiol*. 59(3): 175-178.

Singh, K. M., Tripathi, A. K. Pandya, P. R. 2012. Methanogen diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) assessed by 16S rDNA analysis. *Res Vet Sci*. 92(3): 451-455.

Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12115–12120. doi: 10.1073/pnas.0605127103

Spiegelman, D., Whissell, G. and Greer, C. W. 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*. 51(5): 355–386. doi: 10.1139/w05-003.

Stewart, F. J., Ottesen, E. A. and Delong, E. F. 2010. Development and quantitative analyses of a universal rRNA-subtraction protocol for microbial metatranscriptomics', *ISME Journal. Nature Publishing Group*. 4(7): 896–907. doi: 10.1038/ismej.2010.

St-Pierre, B. and Wright, A. D. G. 2012. Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. *Animal*.1: 49–56.

Ullmann, A., 2011. Escherichia coli and the Emergence of Molecular Biology. *EcoSal Plus*. 4(2). <http://europepmc.org/abstract/med/26442505>

Van, Soests. P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II a rapid method for the detergmination of fiber and lignin. *Assoc. Off. Agr. Chem jour*.46: 829-835.

Wallace, R. J., Snelling, T. J., McCartney, C. A., Tapio, I., & Strozzi, F. 2017. Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0285-6>

Wang, P., Qi, M., Barboza, P., Leigh, M. B., Ungerfeld, E., Selinger, L. B. Forster, R. J. 2011. Isolation of high-quality total RNA from rumen anaerobic bacteria and fungi and subsequent detection of glycoside hydrolases. 598: 590–598. <https://doi.org/10.1139/W11-048>.

Williams, Y. J., Popovski, S. and Rea, S. M. 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Appl Environ Microbiol.* 75(7):1860–1866.

Wilson, D. D., y Deem, E. 2005. Mammal Species of the World (en inglés) (3ª edición). Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2 vols. (2142 pp.). ISBN 978-0-8018-8221-0.

Wright, A. D. G. and Klieve, A. V. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Anim Feed Sci Technol.* 166-167: 248-253.

Wright, A. D. G. Ma, X. Obispo, N. E. 2008. Methano brevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microb Ecol.* 56(2):390–394.

Wright, A. D. G. Toovey, A. F. Pimm, C. L. 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe.* 12(3): 134-139.

Yokoyama, M. T. y Johnson, K. A. 1988. Microbiología del rumen e intestino. En: El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (Ed.). Editorial Acribia.

Zhang, J., Shi, H., Wang, Y., Li, S., Cao, Z., Ji, S., Zhang, H. 2017. Effect of dietary forage to concentrate ratios on dynamic profile changes and interactions of ruminal microbiota and metabolites in holstein heifers. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02206>.

Zhao, S., Zhang, Y., Gamini, R., Zhang, B., and Von, S. D. 2018. Evaluation of two main RNA-seq approaches for gene quantification in clinical RNA sequencing:

polyA+ selection versus rRNA depletion. *Scientific Reports*. 8: 4781.
<http://doi.org/10.1038/s41598-018-23226-4>.

Zhou, M., Hünenberg, M. and Beauchemin, K. A. 2013. Individuality of Ruminant methanogen/protozoa populations in beef cattle fed diets containing dried distillers grain with solubles. *Acta Agri Scand Sect A Anim Sci*. 62(4): 273-288.

XI APÉNDICE
1 protocolo de extracción de RNA

Lisis celular.

1. Previo a la descongelación de la muestra colocar 0.2 g de perlas de vidrio estériles (0.1 g de 0.5 mm y 0.1 mm) de diámetro respectivamente en un tubo microcentrifugo de 2 mL de fondo conico.
2. Descongelar la muestra de líquido ruminal a temperatura ambiente, adicionar 500 μ L de reactivo TRIzol a la muestra de 800 μ L y agitar con vortex. Reposar en hielo durante 5 minutos. Y transferir al tubo con perlas
3. Agregar 850 μ L de reactivo trizol a la muestra con perlas y homogenizar con vortex.
4. Colocar los tubos con las muestras en el equipo de bead beating (BeadBug Homogenizer, BenchMark Scientific) y programar a máxima velocidad (400 rpm) tres rondas de 1 minuto cada una dejando reposar en hielo durante 2 minutos entre cada ronda. Al terminar la última ronda de lisis dejar 3 minutos a temperatura ambiente.

Separación de fases.

5. Agregar 220 μ L de cloroformo Mezclar con Vortex e Incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar la muestra a 12 000 X g durante 15 minutos a 4 °C. (Resultado, capa inferior de fenol-cloroformo, interfase y capa superior incolora con RNA transferir cuidadosamente la fase acuosa (superior) a un tubo eppendorf de 1.5 mL libre de RNAsas.
7. Realizar una segunda ronda con 200 μ L de cloroformo repetir el paso 5 y 6.

Precipitación del RNA.

8. Agregar 550 μ L de isopropanol frio a la fase acuosa colectada por cada Mezclar por inversión e Incubar durante r 10 minutos en hielo. Centrifugar a 12000 X g durante 10 minutos a 4°C.
14. El precipitado de RNA total forma un sedimento con aspecto de un gel blanquecino a transparente en el fondo del tubo. Desechar el sobrenadante.

Limpieza y resuspensión del RNA

15. Lavar la pastilla de RNA con 1000 μ L. etanol al 75%).
16. Centrifugar a 7500 X g durante 5 min a 4°C. Desechar el sobrenadante.
17. Dejar secar la pastilla durante de 15 min a temperatura ambiente.
18. Resuspender en 20 a 50 μ L de agua libre de RNAsas (agua libre de RNAsas).

2. Análisis bromatológico de las dietas.

Determinación de humedad en alimentos y forrajes.

Para determinar la materia seca a 110°C, se colocan los crisoles en la estufa mínimo 4 horas, se sacan y se colocan en un desecador durante 15 minutos hasta que se enfríen a temperatura ambiente, luego se pesa el crisol usando unas pinzas de metal en una balanza analítica y se anota su peso.

Después se pesa un gramo de muestra en cada crisol con la ayuda de una espátula y se colocan en la estufa a 110°C de 18 a 24 horas, una vez que haya pasado el tiempo se colocan en el desecador hasta que estén a temperatura ambiente y se vuelven a pesar, cada muestra se realiza por triplicado.

Para calcular la humedad y la materia seca total se usan las siguientes formulas.

$$\% \text{ de humedad} = 100 - \% \text{ materia seca}$$

$$\% \text{ materia seca} = \frac{(\text{materia húmeda})}{\text{Materia seca}} * 100$$

Determination de Cenizas.

Una vez obtenido la materia seca, los crisoles con las muestras se colocan en la mufla y se comienza a elevar la temperatura de 100 en 100°C hasta llegar a 600°C, a esta última temperatura se mantiene durante 12 h o toda la noche, posteriormente se disminuye gradualmente la temperatura hasta que llegue a 100 °C. los crisoles con las muestras se sacan de la mufla y se colocan en el desecador

para enfriar y se pesan en una balanza analítica. Para calcular el % de cenizas se utiliza la siguiente fórmula.

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(\text{peso del crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso del crisol})}{\text{Peso de la muestra seca}} * 100$$

Determinación de fibra detergente ácida y neutra.

Se pesa de 0.30 a 0.40 g de muestra en una balanza analítica (en nuestros análisis para fibra usamos 40 g), y se pone en el tubo de ensaye ya identificado, posteriormente se pone 30 a 40 ml (según se haya pesado) de solución detergente ácida o neutra según sea, si la muestra contiene fuente de almidón se le agrega 1 mL de amilasa, y se coloca en el digestor a 90 °C, cuidando el momento de ebullición y a partir de ello se cuenta 60 minutos, cuidando que la muestra no se tire y al finalizar el tiempo se colocan en una gradilla. Un día anterior se pone el papel filtro Whatman núm. 540 en una estufa a 110 °C, se ponen en el desecador y se pesa para obtener su peso constante. Después de haber pasado los 60 minutos se retiran del digestor, mientras tanto ya se tiene una olla con agua a 90- 100°C; se coloca el papel filtro en un embudo de la bomba de vacío cuidando que no quede espacio para no perder muestra, se agita el tubo para que no queden partículas y se vacía al embudo con el papel filtro, se prende la bomba y se enjuaga con el agua caliente, este enjuague se repite hasta que no tenga solución en la muestra filtrada, por último se enjuaga con acetona, se retira el papel filtro del embudo y se dobla cuidadosamente y se coloca en una caja de Petri para posteriormente meterlo a la estufa a 110° C por toda una noche. Posteriormente se sacan de la estufa y se ponen en el desecador a enfriar, finalmente y se pesan los papeles filtro que

contienen la muestra y se registra su peso. Para obtener el porcentaje de FDN Y FDA se emplea la siguiente formula.

$$\% \text{ FDN o FDA}_{bh} = \frac{(\text{peso papel + muestra}) - (\text{peso del papel})}{\text{Peso de la muestra BH}} * 100$$

Determinación de proteína

De la muestra se pesa 0.30 g y se coloca en un tubo de ensaye previamente identificado, se vierte 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, a esto se le agrega catalizador de proteína y se ponen el block digestor poniendo cuidado que la campana de extracción esté funcionando por los gases tóxicos que las muestras producen, a una temperatura de 300 a 350 °C por cuatro horas mínimo hasta que la solución se torne transparente o de un color verde pálido, se sacan del digestor en una parrilla hasta que se enfríen tiene que estar encendido el extractor. Se disuelven los sólidos con un mínimo de agua y se echa al destilador, posterior mente se pone 12 mL de sosa, en el otro extremo del destilador se coloca un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 6 ml de solución de ácido bórico al 4% cuidando que la manguera quede dentro de la solución, recuperar 30 mL de la solución destilada y se titula con el ácido clorhídrico al 1 N. La fórmula para determinar % de proteína es:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL HCL}) (1.4) (\text{Normalidad del ácido})}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

$$\% \text{ proteína bh} = (\% \text{ N}) (6.25)$$

$$\% \text{ proteína bs} = \frac{\text{proteína bh}}{\% \text{ ms}} * 100$$

Determinar extracto etéreo

Los vasos de cristal para extracto etéreo se colocan en una estufa a 110 °C mínimo 4 h, se sacan a un desecador hasta que estén a temperatura ambiente se pesan, en un papel filtro pesar un gramo de muestra y se pone dentro del dedal, el dedal dentro del porta dedal y el porta dedal se fija en el soporte metálico del aparato Goldfish, en el vaso se coloca 25 a 30 mL de éter, fijar al condensador con el anillo con rosca apretando para que no se escape el éter, abrir la llave del agua, y prender la parrillas, checar que este en 4.5, y levantar la parrilla que este cerca del vaso. Dejar pasar 8 h, checar en todo momento que no se escape el éter, si eso sucede apretar más las roscas o checar los empaques. Al término de las 8 horas bajar los vasos y poner el recolector, cuando el vaso no tenga éter se baja y se pone a la estufa de 110 °C toda la noche, se sacan al desecador, y se pesan cuando estén a temperatura ambiente. Para obtener el % de grasa se aplica la siguiente formula:

$$\% \text{ E.E bh} = \frac{(pv + pm) - (pv)}{Pm} * 100$$

$$\% \text{ E.E bs} = \frac{\% \text{ EE bh}}{ms} * 100$$

3. Preparación de buffers

Tris acético EDTA (TAE).

Para la preparación de un litro de solución buffer TAE en stock 50x se utilizaron:

- 242 g de Tris base
- 57.1 ml de ácido acético glacial
- 100 mL de EDTA al 0.5 M (pH8.0).

Procedimiento

Mezcle Tris con la barra de agitación magnética para disolver en aproximadamente 600 ml de ddH₂O.

Agregue EDTA y ácido acético.

Aforar al volumen final de 1 L con ddH₂O.

Almacenar a temperatura ambiente

Preparación de EDTA 0.5 pH8

Para la preparación de 1 L de EDTA se requiere:

- 186,1 gramos de EDTA (etilendiaminotetraacetato de disodio • 2H₂O)
- 800 mililitros de agua destilada
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) o sólido (para ajustar el pH)

Procedimiento

Agite 186,1 g de tetra acetato de etilendiamina disódica • 2H₂O en 800 ml de agua destilada.

Agite la solución vigorosamente usando un agitador magnético.

Agregue la solución de NaOH para ajustar el pH a 8.0. Si usa gránulos sólidos de NaOH, necesitará aproximadamente 18-20 gramos de NaOH. Agregue el último NaOH lentamente para no sobrepasar el pH. Es posible que desee cambiar de NaOH sólido a una solución al final, para un control más preciso. El EDTA irá lentamente a la solución ya que el pH de la solución se acerca a 8.0.

Diluya la solución a 1 l con agua destilada.

Filtra la solución a través de un filtro de 0.5 micras.

Dispense en contenedores según sea necesario y esterilícelos en autoclave.