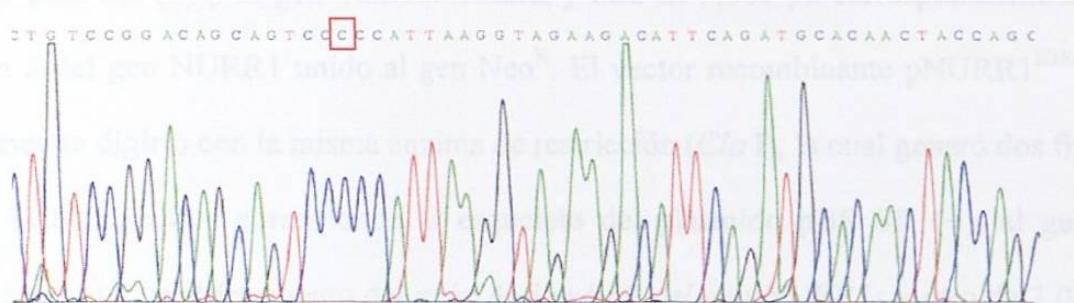
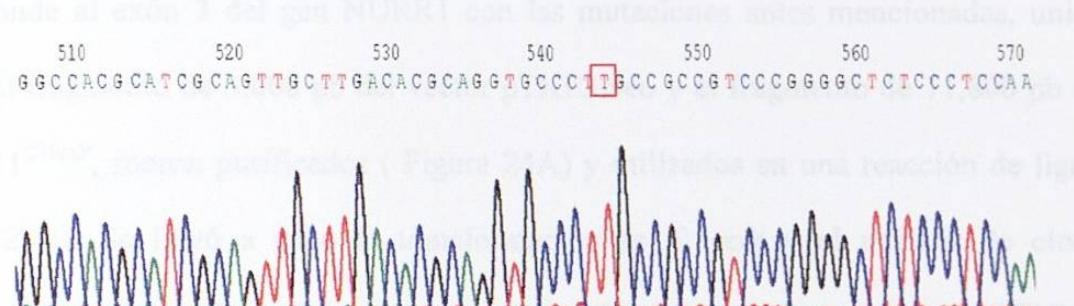
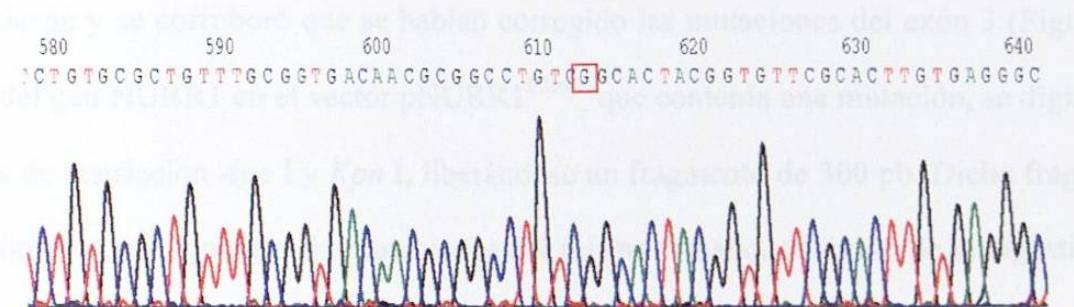


Tabla 4. Mutaciones de las clonas de los vectores recombinantes pNURR1^{E3LoxP}I, II y III.

Posición	Codón	Aminoácido	Símbolo	Carga	Exón
89	TCC → CCC	Serina → Prolina	S → P	Polar → Hidrofóbico	3
250	TCG → TTG	Serina → Leucina	S → L	Polar → Hidrofóbico	3
273	CAG → CGG	Glutamina → Arginina	Q → R	Polar → Básico	3
566	TGC → TAC	Cisteina → Tirosina	C → Y	Polar → Polar	8

A**B****C****Figura 23. Secuenciación de las clonas pNurr1^{E3LoxP} I, II y III. El nucleótido en cuadro rojo indica el lugar de la mutación puntual en las clonas pNurr1^{E3LoxP} I, II y III, del exón 3 del gen NURR1.**

Se procedió a reparar las mutaciones por sustitución del fragmento con mutaciones del exón 3, por uno previamente secuenciado sin mutaciones. Debido a la dificultad de encontrar sitios de restricción para liberar el fragmento del exón 3 con las mutaciones, a partir del vector pTKlox se subclonó un exón 3 sin las mutaciones antes mencionadas, y posteriormente se subclonó el gen Neo^R para obtener un vector pTKE3Neo. Este vector se digirió con la enzima *Cla* I, generando un fragmento de aproximadamente 5,700 pb correspondiente al esqueleto del plásmido pBS SK (+) y el gen Timidin Cinasa, y otro de 3,000 pb correspondiente a la región del exón 3 del gen NURR1 unido al gen Neo^R. El vector recombinante pNURR1^{E3loxP} con las mutaciones se digirió con la misma enzima de restricción (*Cla* I), la cual generó dos fragmentos, uno de 11,800 pb que corresponde al esqueleto del plásmido pBS SK (+), al gen Timidin Cinasa, al exón 2, y al fragmento del exón 4 al exón 8 del gen NURR1; y otro de 3,000 pb que corresponde al exón 3 del gen NURR1 con las mutaciones antes mencionadas, unido al gen Neo^R. El fragmento de 3,000 pb del vector pTKE3Neo y el fragmento de 11,800 pb del vector pNURR1^{E3loxP}, fueron purificados (Figura 24A) y utilizados en una reacción de ligación (ver Figura 24B). Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* y el análisis de clonas como previamente se describió. Posteriormente se seleccionaron dos clonas pNURR1^{E3loxP}, se secuenciaron y se corroboró que se habían corregido las mutaciones del exón 3 (Figura 25). El exón 8 del gen NURR1 en el vector pNURR1^{E3loxP} que contenía una mutación, se digirió con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I, liberándose un fragmento de 300 pb. Dicho fragmento fue sustituido por un fragmento sin mutaciones del mismo tamaño, obtenido de la digestión con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I del vector 05375pPCR-Scripp, generado por la empresa GENEART.

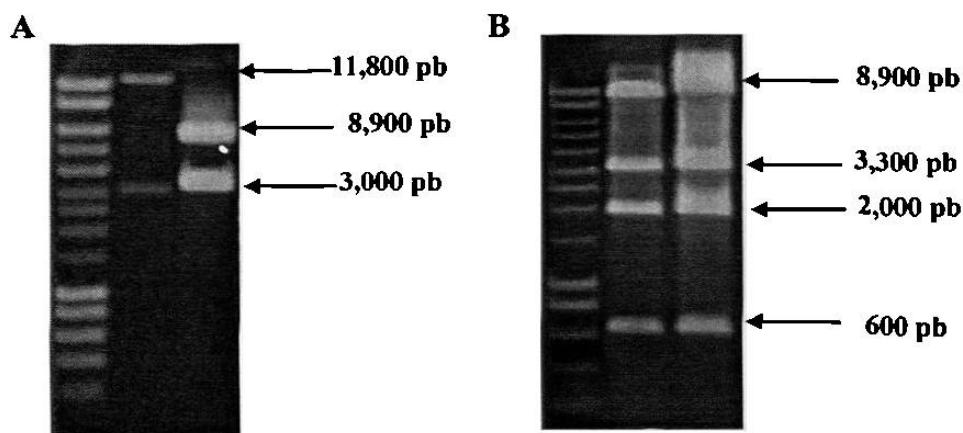


Figura 24. Digestión con enzimas de restricción de los vectores pNURR1^{E3loxP} I, pTKE3Neo, y 053575pPCR-Script. A) M corresponde al marcador de peso molecular de 200 pb, el carril 1 muestra el vector pNURR1^{E3loxP} I digerido con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I, el carril 2 muestra el vector pTKE3Neo digerido con las enzimas de restricción *Age* I y *Kpn* I; B) M es el marcador de peso molecular de 200 pb, el carril 1 y 2 las clonas seleccionadas pNURR1^{E3loxP} digeridas con la enzima de restricción *Hind* III, en un gel de agarosa al 0.8%.

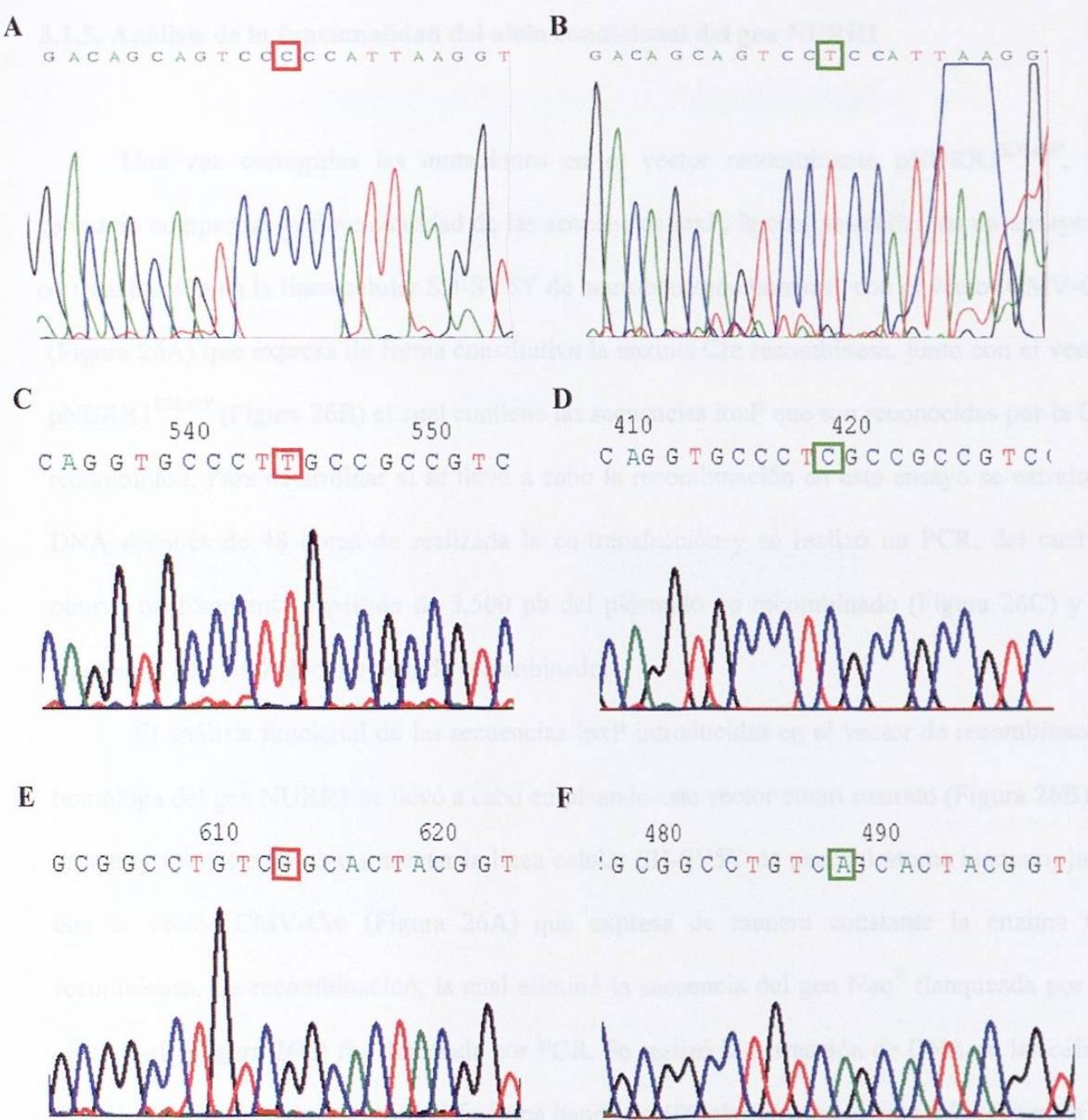


Figura 25. Secuenciación del vector recombinante pNURR1^{E3loxP}. En A, C y E se muestran en un recuadro rojo las mutaciones puntuales del exón 3 del gen NURR1, en B, D y F se señalan en un recuadro verde las correcciones de las mutaciones del exón 3 del gen NURR1 en el vector recombinante pNURR1^{E3loxP}.

3.1.5. Análisis de la funcionalidad del alelo condicional del gen NURR1

Una vez corregidas las mutaciones en el vector recombinante pNURR1^{E3LoxP}, fue necesario comprobar la funcionalidad de las secuencias loxP, la cual se realizó en un ensayo de co-transfección en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, con el vector CMV-Cre (Figura 26A) que expresa de forma constitutiva la enzima Cre recombinasa, junto con el vector pNURR1^{E3LoxP} (Figura 26B) el cual contiene las secuencias loxP que son reconocidas por la Cre recombinasa. Para determinar si se llevó a cabo la recombinación en este ensayo se extrajo el DNA después de 48 horas de realizada la co-transfección y se realizó un PCR, del cual se obtuvo un fragmento esperado de 3,500 pb del plásmido no recombinado (Figura 26C) y un fragmento de 1,500 pb del plásmido recombinado.

El análisis funcional de las secuencias loxP introducidas en el vector de recombinación homóloga del gen NURR1 se llevó a cabo empleando este vector como sustrato (Figura 26B) en un ensayo *in vitro*, al co-transfectar la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, junto con el vector CMV-Cre (Figura 26A) que expresa de manera constante la enzima Cre recombinasa. La recombinación, la cual eliminó la secuencia del gen Neo^R flanqueada por los sitios loxP (Figura 26C) fue detectada por PCR. Se realizó la extracción de DNA de las células SH-SY5Y transfectadas, y se amplificó una banda de 600 pb correspondiente a la secuencia del gen de la Cre recombinasa (Figura 26D), lo cual indica que el vector de expresión CMV-Cre fue introducido en la línea celular y pudo llevar a cabo una expresión transitoria de la proteína Cre recombinasa y por lo tanto actuar sobre el sustrato, al que se le realizó un PCR y nos generó dos bandas de 3,500 pb que corresponde al vector pNURR1^{E3loxP} sin recombinar, y una banda de 1,500 pb del vector pNURR1^{E3loxP} recombinado (Figura 26E), lo que mostró la actividad de la preoteína Cre recombinasa sobre el sustrato pNURR1^{E3loxP}.

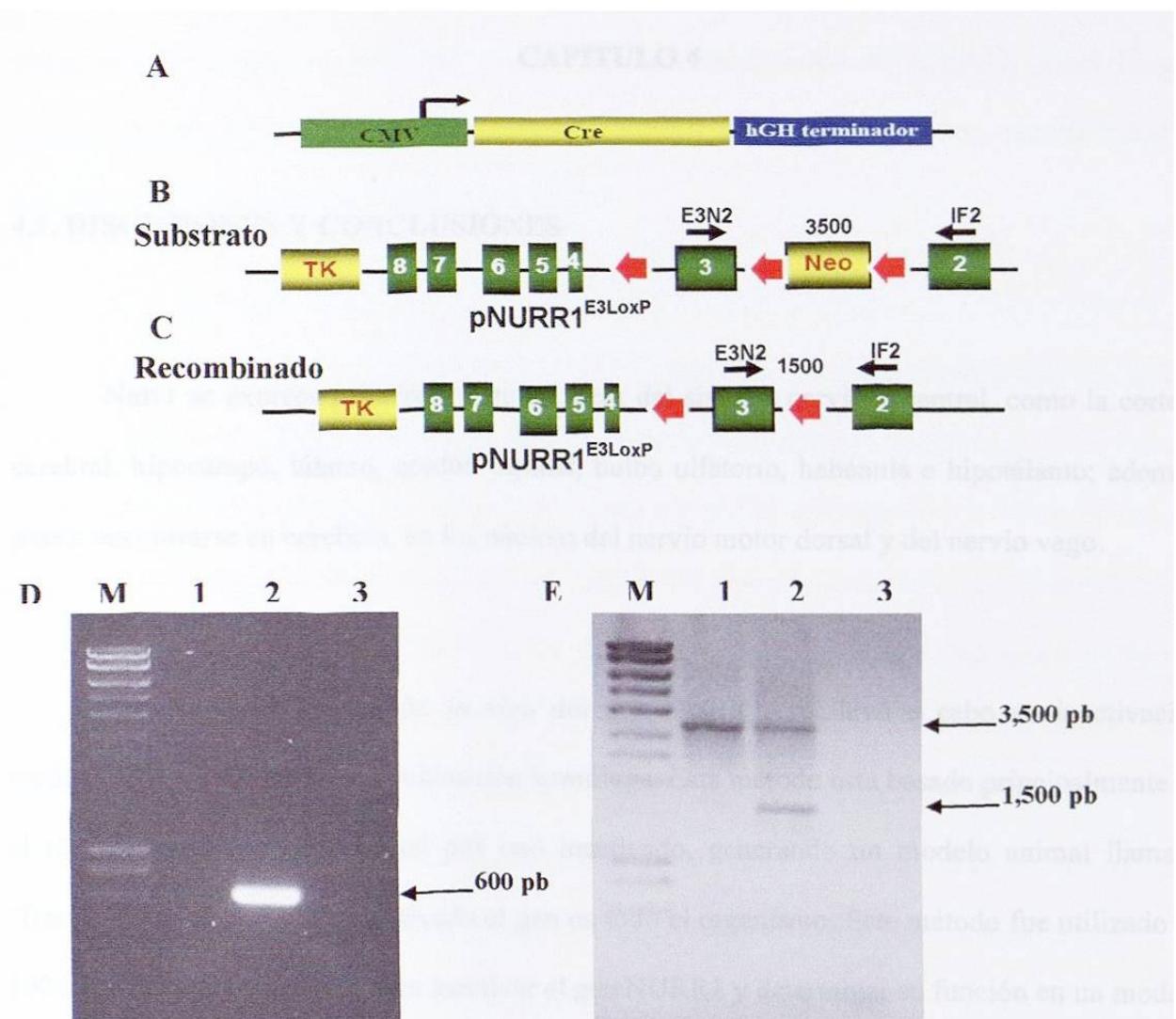


Figura 26. Co-transfección de células SH-SY5Y de neuroblastoma humano con el vector pNURR1^{E3LoxP} y el vector de expresión CMV-Cre. En A) Esquema del vector de expresión CMV-Cre; B) Esquema del vector pNURR1^{E3LoxP} no recombínado (sustrato), la flecha de color negro indica el alineamiento y la dirección de los oligonucleótidos E3N1 e IF2, las cajas de color verde indican los exones del gen NURR1, las flechas rojas indican los sitios loxP, y las cajas amarillas indican los genes de selección, (TK) Timidin Cinasa, y (Neo^R) indica el gen de resistencia a neomicina; C) Esquema del vector pNURR1^{E3LoxP} recombínado; D) PCR del gen Cre. M es el marcador de peso molecular; carril 1, células transfectadas solamente con el vector pNURR1^{E3LoxP}; carril 2, células transfectadas con el vector pNURR1^{E3LoxP} y el vector de expresión CMV-Cre; y carril 3, negativo; E) PCR para detectar la recombinación del vector pNURR1^{E3LoxP}; M es el marcador de peso molecular; carril 1, células transfectadas solamente con el vector pNURR1^{E3LoxP}; carril 2, células transfectadas con el vector pNURR1^{E3LoxP} y el vector de expresión CMV-Cre; y carril 3, negativo;

CAPITULO 4

4.1. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Nurr1 se expresa principalmente en áreas del sistema nervioso central, como la corteza cerebral, hipocampo, tálamo, cordón espinal, bulbo olfatorio, habénula e hipotálamo; además, puede encontrarse en cerebelo, en los núcleos del nervio motor dorsal y del nervio vago.

Para entender la función *in vivo* del gen NURR1, se llevó a cabo su inactivación mediante la tecnología de recombinación homóloga. Este método está basado principalmente en el reemplazo de un gen normal por uno inactivado, generando un modelo animal llamado “Knock-out”, el cual tiene inactivado el gen en todo el organismo. Este método fue utilizado en 1997 por Zetterström et al³., para inactivar el gen NURR1 y determinar su función en un modelo *in vivo*. Los resultados en este modelo animal del gen NURR1, fueron la ausencia de los marcadores dopaminérgicos (TH, Ret, AHD2, y el receptor D2 de dopamina) en las neuronas dopaminérgicas de la región ventral del mesencéfalo. Se encontró que los ratones homocigotos mutantes del gen NURR1 morían en el transcurso de las primeras 24 horas posnatales. Estos datos fueron corroborados por otros dos estudios independientes^{4, 5}, empleando el mismo método de inactivación del gen NURR1 en diferente región.

Debido a que este gen se expresa en diferentes regiones del sistema nervioso central, y a la muerte prematura de los ratones homocigotos mutantes, este modelo no permite resolver las

siguientes interrogantes: ¿Por qué mueren los ratones Knock-out NURR1?, ¿Qué función desempeña el gen NURR1 en las diferentes regiones del sistema nervioso central donde se expresa? y, ¿Cuál es su papel en la etapa adulta?

La finalidad de este trabajo fue obtener un vector de recombinación homóloga con un alelo condicional del gen NURR1, el cual no tuviera mutaciones y portara las secuencias de sitios loxP en las regiones intrónicas 2 y 3, para no afectar las regiones codificantes del gen NURR1. Posterior al aislamiento de las secuencias del gen, se dio inicio a la construcción para introducir los sitios loxP en el alelo condicional del gen NURR1. Al concluir con esta fase del trabajo se procedió a realizar dos análisis importantes en la generación del vector recombinante condicional del gen NURR1, que fueron la secuenciación y comparación de la secuencia obtenida con la base de datos de Celera Discovery SystemsTM, y finalmente un análisis para comprobar que los sitios loxP introducidos en el alelo del gen NURR1 fueran funcionales.

La comparación de las secuencias del vector recombinante con la base de datos, mostró 4 cambios de nucleótido, por lo que se realizó una búsqueda en la base de datos del GenBank, para identificar si estos nucleótidos representaban algún polimorfismo del gen NURR1 en base a algún reporte. En este caso particular, los cambios nucleotídicos encontrados generarían una proteína Nurr1 con los cambios aminoacídicos S89P, S250L, Q273R y C566Y. En el caso de los aminoácidos S89P, S250L y Q273R, el tipo de carga es opuesta al aminoácido de la proteína normal. En los aminoácidos S89P y S250L la carga normalmente es polar; sin embargo, con las mutaciones la carga sería hidrofóbica, lo cual podría alterar la estructura tridimensional de la proteína Nurr1. Y afectaría principalmente la capacidad de activación del factor de transcripción

independiente de ligando, ya que estos cambios se encuentran en la región AF1 que da origen a la vía de activación independiente del ligando.

En relación al cambio en el aminoácido Q273R que se encontró en la región del dominio de unión al DNA del factor de transcripción Nurr1, este cambio podría alterar su afinidad a secuencias en promotores y alterar la expresión de genes blanco, ya que el aminoácido normal tiene carga polar, y el sustituto tiene una carga básica.

El último cambio aminoacídico C566Y probablemente no afectaría la función de la proteína Nurr1, ya que se encuentra en la región del dominio de unión a ligando, el cual no es funcional en el factor de transcripción Nurr1. Además, el cambio de este aminoácido corresponde a uno de igual carga (polar / polar).

Tomando como base este análisis de los posibles efectos de los cambios aminoacídicos antes mencionados, se llevó a cabo la reparación del vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1. La reparación se logró de forma exitosa, ya que la secuencia obtenida del vector de recombinación reparado, presentó un 100% de identidad a la secuencia del gen Nurr1 proporcionada por la empresa Celera Discovery Systems™.

Una vez que confirmamos la correcta construcción de nuestro vector de recombinación condicional Nurr1, procedimos a determinar la funcionalidad de las secuencias loxP introducidas en las regiones intrónicas 2 y 3 del gen NURR1. Las secuencias loxP son

reconocidas por la enzima Cre recombinasa, la cual elimina la secuencia que se encuentra entre los sitios loxP.

En un ensayo de cultivo de células se utilizó un vector de expresión para la enzima Cre recombinasa y nuestro vector de recombinación homóloga condicional (pNURR1^{E3loxP}) para su transfección. El producto recombinado fue detectado mediante la técnica de PCR, la cual nos dio resultados positivos, al menos para los sitios loxP que se encuentran flanqueando el gen de selección positiva Neo^R, ya que el oligonucleótido E3N1 corresponde al exón 3, y el oligonucleótido IF2 al intrón 2. En este experimento no se obtuvo amplificación del gen NURR1 endógeno, debido principalmente a que la línea SH-SY5H corresponde a células de neuroblastoma humano, y los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia del gen murino, aunque el oligonucleótido E3N1 se alineaba al 100% con el gen NURR1 humano, no fue así para el oligonucleótido IF2, por lo que sólo se detectaron los productos provenientes del vector recombinante pNURR1^{E3loxP}, tanto del vector recombinado como del no recombinado.

Con los resultados obtenidos, podemos decir que se logró obtener un vector de recombinación homóloga condicional del gen NURR1, el cual no tiene mutaciones en su secuencia, y que los sitios loxP son funcionales.

Finalmente cabe mencionar que este vector construido será pieza importante para la generación de una línea de ratones, que al cruzarlos con ratones que expresen la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de un promotor específico de tejido, nos permita inactivar el

gen NURR1 en tiempo y espacio. De allí la importancia de contar con esta línea de ratones, ya que nos permitirá conocer más acerca de las funciones de este factor de transcripción Nurr1 que presenta una expresión constitutiva en el sistema nervioso central y que en los últimos años ha despertado un gran interés como gen idóneo en procesos de regeneración e inflamación en diversos órganos periféricos.

CAPÍTULO 5

5.1. LITERATURA CITADA

1. Saucedo-Cárdenas O. and Conneely O. M. Comparative distribution of Nurr1 and Nur77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *Mol. Neuroscie.* 7: 51-63. (1996).
2. Saucedo-Cárdenas O., Kardon, R., Ediger R. T., Lydon J.P., Conneely O. M. Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, Nurr1. *Gene* 187: 135-139. (1997).
3. Zetterström R. H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B. J., Olson L. and Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276: 248-250 (1997).
4. Saucedo-Cárdenas O., Quintana-Hau J.D., Le W.D., Smidt, M.P., Cox, J.J., De Mayo F., Burbach J.P., and Conneely O.M. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4013-4018. (1998).
5. Castillo, S. O.; Baffi, J. S.; Palkovits, M.; Goldstein, D. S.; Kopin, I. J.; Witta, J.; Magnuson, M.A. and Nikodem, V. M. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci* 11: 36-46 (1998).

6. Zetterstrom, R. H.; Williams, T. Perlmann, L. Olson. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. Mol Brain Res 41: 111-120. (1996).
7. Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240: 889-895. (1988).
8. Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. Cell. 56: 335-344. (1989).
9. Tsai, M. J. And O'Malley B.W. MBIU: Mechanism of steroid Hormone Regulation of gene Transcription. R.G. Landes Company. Austin. (1994).
10. Conneely O. M. and O'Malley B.W. Orphan receptors: Structure and Function relationships. M.-J. Tsai and B.W. O'Malley, editors R:G: Landes Company, Austin. 111-133. (1994).
11. Auwerx, J.; Baulieu, E.; Beato, M.; Becker-Andre, M.; Burbach, P. H.; Camerino, G.; Chambon, P.; Cooney, A.; Dejean, A.; Dreyer, C.; Evans, R. M.; Gannon, F.; Giguere, V.; Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. A.; Lazar, M.A.; Mangelsdorf, D.J.; Milbrandt, J.; Milgrom, E.; Moore, D. D.; O'Malley, B.; Parker, K.; Parker, M.; Perlmann, T.; Pfahl, M.; Rosenfeld, M. G.; Samuels, H.; Schütz, G.; Sladek, F. M.; Stunnenberg, H. G.; Spedding, M.; Thummel, C.; Tsai, M. J.; Umesono, K.; Vennstrom, B.; Wahli, W.;

- Weinberger, C.; Willson, T. M.; Yamamoto, K.; The Nuclear Nomenclature Committee, Cell 97, 161-163. (1999).
12. Hazel, T. G.; Nathans, D. And Lau, L.F. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8444-8448. (1988).
13. Arenander, A.T.; de Vellis, J. and Herschman H.R. Induction of c-fos and TIS gene in cultured rat astrocytes by neurotransmitters. J. Neurosci. 24: 107-114. (1989).
14. Ryseck, R.P.; MacDonald-Bravo, H.; Mattei, M.G.; Rupperts, S. And Bravo, R. Structure, mapping and expression of a growth factor inducible gene encoding a putative nuclear hormonal binding receptor. EMBO J. 8: 3327-3335. (1989).
15. Nakai, A.; Kartha, S.; Sakurai, A.; Toback, F.G. and DeGroot, L.J. A human early response gene homologus to murine Nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily. Mol. Endocrinol. 4: 1438-1443. (1990).
16. Maruyama, K., T.; Tsukada, S.; Bandoh, K.; Sasaki, N. Ohkura, and K. Yamaguchi. Expression of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines. Cancer Letters 96: 117-122. (1995).

17. **Hedvat, C.V.** and Irving, S.G. The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen inducible nuclear orphan receptor. *Mol. Endocrinol.* 9: 1692-1700. (1995).
18. **Ohkura, N.**; Hijikuro, M.; Yamamoto, A. And Miki, K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1959-1965. (1995).
19. **Scearce, L.M.**; Laz, T.M.; Hazel, T.G.; Lau, L.F. and Taub, R. RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J. Biol. Chem.* 268: 8855-8861. (1993).
20. **Mages, H.W.**; Rilke, O.; Bravo, R.; Senger, G. and Kroczeck, R.A. NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol. Endocrinol.* 8: 1583: 1591. (1994).
21. **Wilson, T.T.**; Paulsen, R.E.; Padgett, K.A. and Milbrandt, J. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science*, 256: 107-110. (1992).
22. **Wang, Z.**, Benoit, G.; Liu, J.; Prasad, S.; Aarnisalo, P.; Liu, X.; Xu, H.; Walker, N.P.; Perlmann, T. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423:555–560. (2003).

23. Wilson, T.E.; Fahrner, T.J. and Milbrandt, J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell Biol.* 13: 5794-5804. (1993).
24. Harding, H. P. and Lazar, M.A. The orphan receptor Rev-ErbA alpha activates transcription via a novel response element. *Mol. Cell Biol.* 13: 3113-3121. (1993)
25. Hard, T.; Kellenbach, E.; Boelens, R.; Maler, B.A.; Dahlman, K.; Freedman, L.P.; Carlstedt-Duke, J.; Yamamoto, K.R.; Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science*. 249: 157-160. (1990).
26. Kliewer, S.A.; Umesono, K.; Noonan, D.J.; Heyman, R.A.; and Evans, R.M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358: 771-774. (1992).
27. Perlmann, T.; Rangarajan, P.N.; Umesono, K.; and Evans, R.M. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7: 1411-1422. (1993).
28. Perlmann, T. and Jasson, L. A novel pathway for vitamin A signalling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and Nurr1. *Genes Dev.* 9:769-782. (1995).

29. Law, S. W.; Conneely, O. M.; DeMayo F. J.; O'Malley, B. W. Identification of a new brain-specific transcription factor NURR1. Mol. Endocrinol. 6:2119-2135. (1992)
30. Sotiriou, T.; Bezouglaia, O. and Tsingotidou, A. Parathyroid hormone induces expresión of the nuclear orphan receptor Nurr1 in bone cells. Endocrinology Vol 142: 663-670, (2001).
31. Bertrand, J.; Wallen, A.; Benoit, G.; Murata, T.; Okret, S. and Perlmann, T. p57^{kip2} cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. Proc Natl Acad Sci. U S A 100(26): 15619-15624. (2003).
32. Asa Wallén, Rolf H. Zetterström, Ludmina Solomin, Mariette Arvidsson, Lars Olson, and Thomas Perlmann. Fate of Mesencephalic AHD2-Expressing Dopamine Progenitor Cells in Nurr1 Mutant mice .Cell Reserch 253: 737-746 (1999).
33. Nsegbe, E.; Wallén-Mackenzie, Å.; Dauger, S.; Roux, J. C.; Shvarev, Y.; Lagercrantz, H.; Perlmann, T.; Herlenius, E. Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. J Physiol (Lond) 556:43–59 (2004).
34. Smidt, M.P.; van schaick, H.S.A.; Lanct, C.; Tremblay, J.J.; Cox, J.J.; vander Kleij, A.A.M.; Wolterink, G.; Drouin, J. And Burbach, J.P.H. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 94:13305-13310. (1997).

35. **Marsden, C.** Problems with long term-levodopa therapy for Parkinson's disease. Clinical Neuropharmacology, 17: S32-S44. (1994).
36. **Wagner, J.** Akerud, P.; Castro, D. S.; Holm, P.C.; Canals, J. M.; Snyder, E. Y.; Perlmann, T and Arenas, E. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. Nature Biotechnology 17:653-659. (1999).
37. **Lakso, M.**; Sauer, B.; Mosinger, B. Jr.; Lee, E. J.; Manning, R. W.; Yu, S. H., Mulder, K. L.; Westphal, H. Targeted oncogene activation by site specific recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 89:6232-6236. (1992).
38. **Orban, P. C.**; Chui, D.; Marth, J. D.; Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 89:6861-6865. (1992).
39. **Upegui-Gonzalez, L.C.**; Francois, J.C.; Ly, A.; Trojan, J. The approach of triple helix formation in control of gene expression and the treatment of tumors expressing IGF-I. Adv.Exp.Med.Biol. 465:319-332. (2000).
40. **Majzoub, J.** and Muglia, L. Knockout mice. New Engl J Med. 334: 904-907.(1996).
41. **Robertson, E.**; Bradley, A.; Kuehn, M.; Evans, M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. Nature; 323: 445-448. (1986).

42. **Evans, M.** and Kaufman, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292: 154–156. (1981).
43. **Martin, G.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in media conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 7634–7638. (1981).
44. **Bradley, A.; Evans, M.; Kaufman, M. and Robertson, E.** Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 309: 255–256. (1984).
45. **Smithies, O.; Gregg, R. G.; Boggs, S. S.; Koralewski, M. A.; Kucherlapati, R. S.** Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 317: 230–234. (1985).
46. **Thomas, K. and Capecchi, M.** Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51: 503–512. (1987).
47. **Galli-Taliadoros, L. A.; Wood, S. A.; Sedgwick, J. D. and Korner, H.** Gene knockout technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods*: 1811-1815. (1995).

48. Araki, K.; Araki, M.; Yamamura, K. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 868–872. (1997).
49. Wunderlich, F.T.; Wildner, H.; Rajewsky, K.; Edenhofer, F. New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility. *Nucleic Acids Res.* 29: e47. (2001).
50. Nagy, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109. (2000).

ANEXO I**Mouse nurr1 genome in Chr 2**

```
>cmgd_gene|mCG19702.1 /gene_uid=100000115005921 /len=27106 /
ga_name=GA_x6K02T2Q125 /seq_alignment=(18780257-18753151) /g
ene_alignment=(18770257-18763151) /transcript_names=mCT21440
.1
```

AGTTACGAGCCACGGACAACGTCTCCACTTCTGCTAAAGGGTGTAGGGAGGGTATGTT
 GGGGAGCTGCAAGGCACACCTCTGCCCTCGGCCAGGTGCTAGCTACCTGGCCCACGC
 GAGTGTCTTCCGTTCAAGCTTTGTTGACCCCTCCCCACGTGTGAGGACGCAAGGTC
 TGGGGCGGGGAGGGCAGGTGGAGCGTAGCATCACACGGACTTCACGGACCTGGTTG
CAGAACGTACACTTCTTCGAAAAAAAATCCACCCAAGTGGCTACCAAGGTGAAC
 CGTCCCACCTAAATCAGCCCCAGTCGTGACGTAGTCGAAATATACCAAAGCGAG
 CGCGGGCCAGGAGTCCGGGGAGCGCGGCTCGGCGATTGGACCGCGGGCGCTGACGC
 GGGCTGACCGCGCAGACTTAAAGGTGCATGGCAGCAGCAGCTCGAGCCACATAAACA
 AAGGCACATTGGCGGCCAGGGCAGTCCGCCCCGCGCTCCGACAGCTCCGCGTCCCTC
 TCTCCGGCCCCGCTGGCTGCCTCCCTCTCGCGCCGGCTGGCTGCGTGTGGCTCTCC
 GCGCCCCCGCTCCGCAAGCGCTCCGCGGACCCGGGCTCCCTCTCGCTCCGGAGGGAACTGC
 ACTTCGGCGGAGTTGAATGAATGAAGAGAGCGGACAAGTGAGTAGCTGCGGCGGGCCGC
 CCGCGGTACCGCTCCCGGTCTCCGCGTACCAAGGGAACGGGTTCTGCAAGTGGTC
 GCCCGAGCCCGGGAGCGCGAAGGGGCTGGGAAGGGGATGGCAGTGGCGCGCAGC
 TCCGCCAGCCTCTGCTGAACTCCGGTGTAGCGTAAAGGGGGGAGTGGCTGCCGG
 CAGAGGTTCCAGGCTCTCATGGTGGATGTGGCAAGGGACTCCCACAGTTAGGAG
 AACCGGACTTGGGGAGATGTGCGAAAGTTGCTCTGGTGTGAAATTGATTGTGG
 CTTGAGGAGGCTCCATCTCGCAACATGTGGAAACAGTCCGGAGAGAAAGTTACGTG
 TTGCTGGAACAGTGTGCGCTGGCTCGCCGCTGGGGAGGTTCCGGATATCGTCGA
 GTAAGGGTAGTGTGCGTAGAGGGCTGTAGCGAAGTTGCCTGAAATGACTGGTTTGAT
 ATATGTTGCTTGGATAGTGTGTCAGTGTGCGTGGAGGAAAGAACGGTTATGAAA
 CTGTGACATAGCCACGGTTAATATCCAGAACAGACATATTTCAAGGGCGGCGGCGAT
 GGGGGTGGGGAGATAAGCAAAGCCTCTGGTTCTGGTAAACCTTCCGCTCCTT
 GAAGCAAAGCAAGATTGGAAGAAGTGGGGGGGGGGCGGAGAGGGGAGGGAGCAAAG
 GAGAGGGTGTTCAGGTTCTTACTTATCAACAAGATCGTCTATGCTCTAGAATGCC
 GCAAGTGGAACATCTGAAAAAAATAGCTAGGACACAAGAATGCCCTGTCCCAGCAA
 GTAGGCAGCCTGTGAAAGCATTGGAGAAGGTGTCAGTTGCTGTGCTGAGAAGTGC
 TTCTAACTTGGTGCATATCATATGCGTAATATTCTTCCCTCTGCAGTTGACCAA
 GATACTCCGGTAAAGTAGAGATCTCTCATCACCTCTGGCCATTAAAGATGTTGAAA
 ATCCAGTTCTGGAGGAACACCAATTGCGTTGCCCTTAAGATCCTGTGTTGAAACCAA
 AGCAATTACTAAAGCTACACACTTGTCCCACATTGGCTGTTGGTGTCCAGGCCTTGC
 TAACGTTCTAAGGGTGGACTGTATTTTTTTACGGTTACTCTCGAGTTCT
 TTAACTTTCTTCTCTAAGAGAAAAGTCCACTGGACTCTAAGAGAGATATTAAGAG
 GAAGCTTGTGCTGTTTCTTTACCCAGACTCTTAGGTTGACATAAAAGTAGAA
 TGACAAAGGCCCTCCATCTACAGCAAAGGGCCAATTCAATTATGATCAGTATCTGG
 TAGACTCATGGATAATTCCCCACAGGATGCTTCTGCAGGGATTACACTGGGAGA
 TGAGCGGCATTATCTGCTGTTAGCCACCTTGTCTGCACATTCAATTAAAGATGCTG
 TTGGGTAAGTCTTACACTCATTCAGGAAGCAGTTGAAGGGCCTGCTGAGTGAGTC
 TGCATCTGCCAGCCAAAGTCTGGTGGGAAGACATCTGAAACCTCCTGTGCTGTATT
 TCAGGGAGATCTGACGGGCTGGATTCCAAATAGCTTTAAATCTGGAAACTTTG
 TCCCTCGCTGAATTACGACACTGTCCACCTTAAATTCCCTCGAAAAACTCCAATAACTCT
 CTGAAGGTCACTGAGCTTATCTTCATTACCTTCTGAGTCCCCCATACCCTCAGAA
 AAACAAAACAAAACAGGGCAACAGGATCTTCAGGCCAACCTGTGCCTTATAGTCACA
 GAGGACAACTTCTTATTGTGCAATTCAACTCATTCTAGAGCATGGCTCTAGAAATC
 CTGTCGACCCCTGAGCTCAAAGAAGAAGCTCATCAGAGTGGACTGTCTGCCGGAAAGGGG

GTGGAGCGGGGGGGGGCGTTGGAAATGAGTGTAGACCTAACAGCTTCAGC
TCTGGGTCGTCCCAGGATCAGCCCTTCTTCATCGCTTCCACCTCTTGCCCC
TTCCCCCTGCATCCCTAAACCCCCATCCTCTCCCCGCCTCCCTCACCCCCAACCCGAC
GCCGCGGGCTGCCGGTAGCCCCGGGTAGACCGAGCCGGAGAAGAAAGTGTCAAGTG
ACCAGGCTGAGTGTATATCACCCCTGTTCCAGCCATGCCCTGTGTTCAAGGCGAG
TATGGGTCCCTGCCTCAAGGAGCCAGCCCCGTTCTCAGAGCTACAGTTACACTCTCG
GGAGAATACAGCTCCGATTCTTAACCTCCAGAGTTGTCAGTTAGCATGGACCTCAC
AACACTGAAATTACTGCCACCACCTCTCTCCCCAGCTCAGTACCTTATGGACAAC
AGCACAGGCTACGACGTCAAGCCACCTTGCTTGTACCAAATGCCCTGTCGGACAGCAG
TCCCTCATTAAAGGTAGAAGACATTCAAGATGCACAACTACCAAGCAACACAGCCACCTGCC
CCTCAGTCCGAGGAGATGATGCCACACAGCGGGCGTTACTACAAGCCCTTCTGCC
CCGACACCCAGCACCCGAGCTCCAGGTGCAGCATAGCCGATGTGGGACGATCCGGC
TCCCTCACAACCTCCACCAAGAACTACGTGCCACTACGGCATATGATGAGCAGAGGAAG
ACACCTGTCCTCCGCTGTCACTCTCTCTTAAGCAGTCGCCCGGGCACTCCTGTG
TCTAGCTGCCAGATGCCCTGACGGGCCTGCACTGCCATGAAACCCGGAGCCCG
GCCAGCCACACAGTAGGGATGGGAGACCTTCGCCGTGCCAACCCATTCCAAGCC
GCATCCATGGCTTCCCGGGCTGCACTGCCACGCACTGCCAGTTGCTTGACACGCAG
GTGCCCTGCCGCCGCTCCGGGCTCTCCCTCAATGAGGTCTGTGCGCTTTGCC
GACAACGCCCTGTCAGCACTACGGTGTGCACTTGTGAGGGCTGCAAAGGTTCTT
AAGGTGAGCAAGACAGGGCGGAGGTGGCAGGTAGCGGCCCTTATACCTGAGACCCAGCAG
TGTACCCCTCACCTCCGGTCGGCAGCCCCGCTCGAGTCCCTGCACTACTCACAGGCTG
TGGAAAGAGGTTGGGGGTGTCTAAGGAAAGAAATCAGAAAGACTGGTAGAGTCAGGGTT
TCATCCCCCGCCCCCGCCCCACAGCAACCTGCCGGGGCTCCAGCCGAA
ATTGCTGGAGCCAGAGTTGGAGAGGGCTATTGCACTGTGTTAGGCCTGCTTCC
TCAGATTGAAATTGGTTAGGACAGAGAACCGTGTGAGCTAACCAAGTGGAACAGAATT
CCCTATGGTCAAATTAAAGTGTCTTATTGCCATCCTGATTGAATAATCTTATCAT
TTAAATAGAGAAGGCTCCAAGGAATGTAATAATGAATGCCACGGATTGTATT
ACTGAGCGTCTCTGCCCTTCTCTGGCATATAAAACACAGCAAGGAGCGGTAGGTTA
GCTCAAATGTTAACGCTATCAATTCTCTGGTAATGCCCTGGGAGGAAAGGAAAG
GAAATAGGAAGAAAAGAAAAGGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAATTGAAGGAGTAGTGTGTTATGTTGAGGAAGGAATG
CAGATCCAAGCCATTAAAAAATGTCAGTTGCTGACTTGGACTTTGAGTGA
TAATCATTTGGGCCTACATTCTCCCTACAGGCCACGGTGC
TATGTGTGTTAGCAAATAAAAACTGCCAGTGGACAAGGCCGCC
TACTGTCGGTTTCAGAAGTGCCTAGCTGTTGGATGGTAAAGAAGGTAGGTCAGGGCAA
GTTGTTGACCTCCATTACGCCCTGAAAGTCCACAGCTGCTTGACTCC
CTGCCCTACTCCCCAGGCCCTGACTCCAGGATTCCACTGCTAAC
AAAGCCACCCGGCCCTTTCTTAAGTATAGGACCCAGTTGGAGGAAGGTATAAA
AACCCGCCATTATAATGCTCTCGTCAGTAAAGTCTTAAATCAGAGGAGCCCTGGA
CCACCAAGGTTGGGCTCTTCACTGTTCCCTGGGGAGGGCCGTGAGGAGCTGAGTC
TGGGCTCAAGGGAACAGCTTAACCCCTGAGTAATTCTTACAGTGGTTCGCACGGACA
GTTAAAAGCCGGAGAGGTGTTACCTCGAAGCCGAAGAGCCCACAGGATCCCTCTC
CCCCCTCACCTCCGGTGAGTCTGATCAGTGCCTCGTCAGAGCCACGTCGATTCAATC
CGGCAATGACCAGCCTGGACTATTCCAGGGTAAGAAGCCGGTGGGGGGAAATCAATC
ATGTGGACAAGCCAAACAAATGGCAGGACCCCTCTCCCTAACCAACTTGGCAGGTTCA
AACTCAAGGTTAAAGGAGGAACAGCAGAAATACATACTTCACA
GGAGACAGGTGGTGTCTCAAAGTACAGACCCGGAGAACACACCCGGAGGGTTGAATCTT
TGTGAACCATTATTGTCGACAGTCCCTCAGCTGCCGTGGAAGGCAAACCTAGACA
GTCAGCCTCCTCCCAAGTCACTTACGAAGTTACTAGAATACATTCCCTCC
TGACTTGTCTGGGGCAGGGAGTGAAGAAGAGGGTGGAGGGATGGCAATGGGGGGGG
GTTGTCCTGGGGCTAGGGATCAAGTGGTCAGTGGCAATTCTTTACTCCAGCTGTGAAA
GTGCAAGGCTTGGGAGGGAGTGTGGCAAACCTAGTAGCGACTGCAATATTATAAG
CTTGCAAAAGGCGCTCCGTCAAGACCCACTCTGGGATTAGCATGAATACTACCGTGT
CAATTGTTGTGGCGATAAGACTGAACGTTCCAGGGCTGGACTGGCACTGTATTAGT
CTGTATGGAAATGGTAAATTACATATTAAAGCAGCGACCTCATAGCACCGTCC
GAATTAAATTGCCCGAACATCTAATTCTTACTGGTCAAGAGAGGTTAATTGTTAT
AAAAACCTGGCTCCCTACTAGAAACGGGTTAGCAATTTCACGGGTTATATTTAGA

GAACCTCATTAAGTGTCTTTAAATGAAATTCCAGTCCAGGCCAACCTGACTATCAG
 ATGAGTGGAGATGATAACCAACATATCCAGCAGTCTACGATCCTGACCGGCTCTATG
 GAGATCATCAGAGGGTGGGCAGAGAAGATCCCTGGCTTGCTGACCTGCCAAAGCCGAC
 CAGGACCTGCTTTGAATCAGCTTCTAGAATTATTTGTTCTGCCTTAGCATACAGG
 TAATGAATGAGGCCTGGAGGAGGGATCAGAAGTAAAGGAAGAGAAAAGGGTTGGG
 GTTGGAGGCAAGATAAAAACAAGCAAAGTGAAGAAGGGAGGAGTGAGCCAGAGCCT
 TGGGTGACCGGAGTGGTGGGATAGGGAGTTCTGATTGTATGAAATTAAACCCCT
 TCAAGGTCCACTGGTCTACATTATTAACTCTCAGTAATTAGGTGCCTCTAAATCCC
 TCATTTATTGCTCTCAAGTAATTAGTGTCTAGCTCTCTCTCTCTCTCCCT
 CTCTCTTGGTATTAATTGCAGGTCCAACCCAGTGGAGGGTAAACTCATCTTGCAATG
 GGGTGGTCTTGCACAGGTTGCAATGCGTGCCTGGCTTGGGAATGGATTGATTCCATTG
 TTGAATTCTCCTCCAATTGCAAGAATATGAAACATCGACATTCTGCCTTCCTGCATTG
 CTGCCCTGGCTATGGTCACAGGTCACTGCTGGTGCAGGACACTTCCCTCCGAACCT
 TCCTCTGGTGGGACCGGTATGGCTTCCCTAATCGCAGATTCTCTGATTCTGCCATC
 TGACTAACTCCCCCTCGCATTCTTGTCTGGTGCATTCTGCAGAGAGACACGGG
 CTCAGGAACCCAAAGAGAGTGGAAAGAGCTACAAAACAAAATTGTAATTGCTTAAAGAC
 CATGTGACTTCAATAATGGGGTTGAAACCGACCCAACTACCTGTCTAAACTGTTGGG
 AAGCTGCCAGAACTCCGCACCCCTTGCACACAGGGCTCCAGGCACATTCTACCTGAA
 TTGGAAGACTTGGTACCAACCACAGCAATAATTGACAAACTTTCTGGACACCTTACCT
 TTCTAAGACCTCTCCAAGCACGTCAAAGAACTGGAAAGAAAAAAATAACATCCAG
 AGGGGGCTGGTCACATGGGCAGAGAGCTGGTGAAGTGTCCAGTTCACCTTATCTCCCT
 CTGTAGACCCCTAGCCCTACCCCTTAAGTAAACAAACAAACAAACCAAAATAAA
 AACTGTCGTATTCCTAACCTGCAGGCAGAACCTGAAAGGGCATTGGCTCCGGGCA
 TCCTGGATTTAGAAAACGGACAGCACACAGTACAGTGTATAAACTTTTATTACAGTT
 CAAAATCAGTTGTTGTCAGAAGAAAGATTGCTAATGTATGATGGAAATGTTGGCCA
 TGCTTGCTTGTGAGTTAACACACACACACACACACACACACACAC
 ACACACACACACACCTTAATGGGACCCCTCTATTGCCCCTTAACAGACTTCAAAGTT
 TTCTGCTGTAAAGAAAGCTGTAATATATAGTAAAACAAATGTTGCGTGGGTGGCATGAA
 TTGAAAGGAGGCTGTAAATTATCCAATGCAGTTGGCTTTAAATTATTTGTGC
 CTATTATGAATAAAATTACAAATTCTAAAAGTAAGTGTGTTGCAAAAAAA
 GAAAATAACTACATAAAAGGGGACAAGCAGTGTGATTCTAGGTTGAAGATGTTAGGCA
 CTTGCTACTTCAGTAATGTCTATATTATATAAAATAGTATTCAGACACTATGTAGTCTGT
 TAGATTTATAAAGATTGGTAGTTATCTGAGCTTAAACATTCTCAATTGTATAATAG
 GTGGGCACAAGTATCAGTACATTGAAAATCCTGACAAAAGGGACACATAGTGTGAA
 CACCGCCCAACATTCTGTTGTAAGTGTATGACCGTTGATGTTGATAAAAGAAA
 GTTTATATCTGATTATTTGTGCTAACAGCTAACAAACTTGCACTGCAGCAGCTTT
 GACTGTTCCAGAGTGTCTATAATACATAACTCCCTGGAAATTACTGAGCACTTGAA
 TTTTTGTTTGTCTAAATTGTCAGTTAATATATTATTTATGTTGA
 GTAAGAATTAAATATTGCCATTCTGTAGTTCTTGTATATTCTAGTACGGCA
 CATGAGATGAGTCACTGCCTTTCTATGGTGTACGACAGTTAGAGATGCTGATT
 TTTCTGATAAAATTCTTCTTAAGAAAGACAATTAAATGTTACAACAATAACCAC
 GTAAATGAACAGAACTCTGTCTATTCTGGGCCAGGAAATGATTACTAAACAACAGGT
 ACAAGAAAGAGGCAGAAAGTGGAGACTGATTGGGGAGGTCACTACAGGACATCTGAATT
 TCAGACTGACAGCTAGATCCATTGTCAGGCAAAGGGAGGGTGTCACTAAACTAATTATCC
 AGAGAATTCTGCACTGTTTTTTTTGTTGTTGTTGTTTTTT
 CTTTGCCTGAATTTCAGTCTGCTGACCTACATTATCAGAACACTTAAATCT
 ACTCTGTAAGTTGAGTTAACGTGCACTTAGGAGACCAACAATCTGAACTTTCCAAG
 TTGGGAATCTGTGAAGTTGGGGGGGGGGGGAGGGGACAGCATCCGAAGTTGTGCTTG
 GAGATTGAGAAAGGCAAGATTGAAATTCTCTTACTTATCTTGCTCTTCAATTCT
 GTGCATGCTCTATGAGTGTGGGACCGAGCACTCCAGGCCCTCTGCTGGAGTTCTGAGTC
 AGCCTCCCACTAGAGCTCTGGAGAGACATTCTTTCCCTCTGGTGGGGAGTG
 ATGAGGTGTGCTTGAACCTTAAACTTCCACCTCTAATTATTCAGATTAAAAAA
 AAGATCCTGTCCAGTCTGGATCTAGTTAACATGAGGCTCTCGTATT
 CCATTCAAGAACACTTCCGGAGGAAGGGGCCAGTTCTCAGCTGATCTGGCTTC
 AACCAAGGTATCCTGGCAGATGGTAGTCCAGTTCTGCCTGGCTGAATTAAAGGAGAG
 ATTAAAGATGGGTGATCCTGCTTCAATTACAGATAGTTGGGGTCA
 CCGAAATTACAAACAAAGAAACAAACAAAAAGGTCTTCAATTAAAAAATGGCT

GTCAGAAGAGTATCCTGCCGCCAGTTACCTGGTCTCACTCCTTACCCGTCAAAACAAT
TGTTTATGGTTGGCAAAAAGAGACAAGGAAAGTCCCTGTGGTAGTTAAAGCTATTT
TACTGAATGGGTTCTCTGTGAGGGTAAAGGAATCGGTATAGGTATCAAACAGG
ACATGTCCAATTTCTAGTGTATGTGCATTAAAGATCAGACCAGCGACTGCATTT
ATTTCACATCTTATTTGAGTCAAAACCAAAACTCTTAAGTAGACAGAATGAGCTTT
CTCCCAGGTGTCTGCCCGGAGACAATTACATTTACTGCAGAATCCCTAGAGTTGAG
CCCAGAAATGAACCCCCAAGGCTGATTCTCCCCAAAGGACTCCGCAGGCATCTGAGG
CCATGACGGCGTCAGGGAAAAGTGAGTCTGGAGACTTAAGAGATCCATGCTTCC
TTGTCTCCGTACTGCATCTACTGGCTGGATTGTGATTCCCTAGGTTGTCCCTGGTAAGGT

ANEXO II**Secuencia del vector pCR 2.1**

AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCTGGCCGATTCAATTAAATGCAGCTGGCACGACAGGTT
 TCCCAGTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAG
 GCTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTACACAGGAA
 ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTGGTACCGAGCTGGATCCACTAGTAACGCCGCCAGTGTGC
 TGGAATTGCCCTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGTCGAGCATGCATCTAG
 AGGGCCAATTGCCCTATAGTGAGTCGATTACAATTCACTGGCGCGTTTACAACGTCGTGACTGG
 GAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATGCCCTTGAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG
 AAGAGGCCGCACCGATGCCCTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGC
 GCGCATTAAAGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTACACTGCCAGGCCCTAGCGC
 CCGCTCTTCGCTTCTCCCTTCGCCACGTTGCCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG
 GGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAACTGATTAGGGTGTAG
 GTTACGTAAGGGCATGCCCTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAA
 ATAGTGACTCTGTTCCAAACTGGAACAACTCAACCCATCTGGCTATTCTTTGATTATAAGG
 GATTGCGGATTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAAACGCGAATTAAAC
 AAAATTCAAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGAGAACCGGTGCTG
 ACCCGGATGAATGTCAGCTACTGGCTATCTGGACAAGGGAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTA
 CCTGCAGTGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGCGGTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAAATTGC
 CAGCTGGGCGCCCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTCTGCCGCAAG
 GATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTGCATGATTGAACAA
 GATGGATTGCACCGCAGGTTCTCCGGCGCTGGGTGGAGAGGCTATTGGCTATGACTGGCACACAGA
 CAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTCAAGGAGACAGGATGAGGATCGTTGCATGATTGAACAC
 CGACCTGTCGGTGCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGACAGCGCGGCTATCGTGGCTGCCACGACGGC
 GTTCCCTGCGCAGCTGCTGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTGC
 CGGGCAGGATCTCTGTCATCCCACCTGCTCTGCCAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCG
 GCGGCTGCATACGCTTGTCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCA
 CGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGCTCGGCCAG
 CCGAACTGTCGCCAGGCTCAAGGCGCGATGCCGACGGCAGGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGC
 CTGCTTGCCTGAAATATCATGGTGGAAAATGCCGCTTTCTGGATTCTCGACTGTGGCCGGCTGGTGTG
 GCGGACCGCTACGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTGGCGCGAATGGCTG
 ACCGCTCCCTGCTGCTTACGGTATGCCGCTCCGATTGCAAGCGCATGCCCTCTATGCCCTCTGA
 CGAGTTCTCTGAATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTT
 TTGCGGCATTTGCCTCCGTGTTGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGGTGCACTGAGTGGTTACATGAACTGGATCTCAACAGGGTAAGATCCTGAGAGTTTCGCC
 GAAGAACGTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTCGGCGGTATTATCCGTATTGACG
 CGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC
 AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC
 ACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTGACACACATGG
 GGGATCATGTAACTGCCCTGATCGTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGA
 CACCACGATGCCGTAGCAATGGAACAAACGTTGCGCAAACATTAAACTGCGAACTACTTACTCTAGCT
 TCCCGCAACAATTAAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCCCTCGGCC
 CGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAACTGGAGGCCGGTGGCTGAGCGTGGCTCGCGGTATCATTGCA
 GGGCCAGATGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCACAGCACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA
 CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTCAAGGCAAGTTACT
 CATATATACTTATGATTGATTAAAACCTCATTTAATTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTG
 TAATCTCATGACCAAAATCCCTAACTGAGTTTCCGTTACTGAGCGTCAAGGCCGTAGAAAAGATC
 AAAGGATCTCTTGAGATCCTTTCTGCGCTAATCTGCTGCAACAAAAAAACCCAGCTAC
 CAGCGGTGGTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGC
 GCAGATACCAAATACTGTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTCAAGAACTCTGTA
 CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCGAGTGGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTACCG
 GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCCCGCTGAACGGGGGTTCGTGCACACA

GCCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGGCCACG
CTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGCACAGGTATCCGGAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
ATTTTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCCCTTTACGGTTC
CTGGCCTTTGCTGGCTTGTACATGTTCTCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
TTACCGCCTTGAGT GAGCTGATACCGCTGCCGCAGCGAACGACCAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA
GGAAGCGGAA

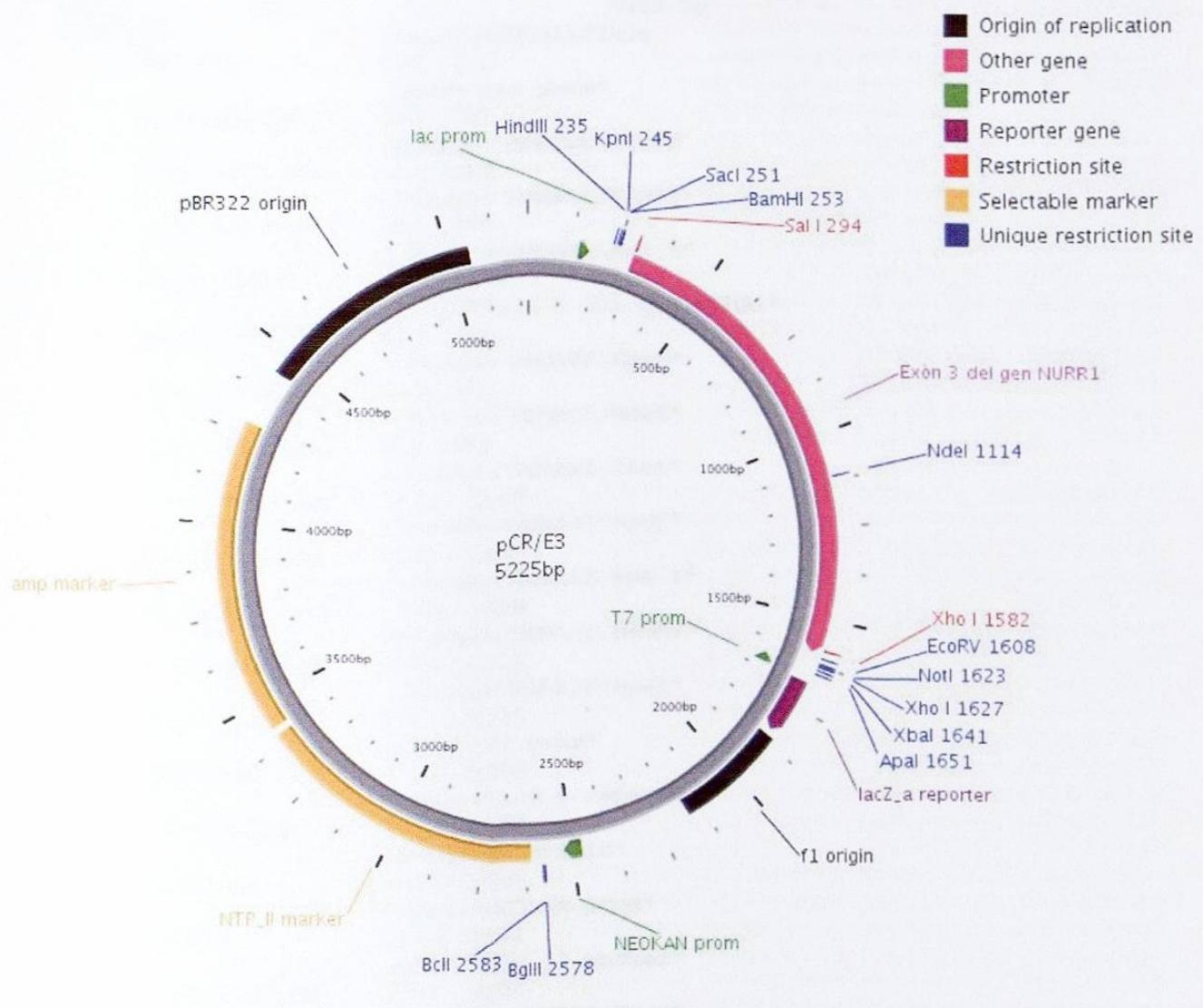
ANEXO III

LOCUS	dna	5225 bp
FEATURES		Location/Qualifiers
Promoter		143..172 /gene="lac prom"
misc_binding		234..239 /dbxref="REBASE:HindIII"
misc_binding		240..245 /dbxref="REBASE:KpnI"
misc_binding		246..251 /dbxref="REBASE:SacI"
misc_binding		252..257 /dbxref="REBASE:BamHI"
misc_binding		293..299 /dbxref="REBASE:Sal I"
other_gene		293..1594 /gene="Exón 3 del gen NURR1"
misc_binding		1112..1117 /dbxref="REBASE:NdeI"
misc_binding		1581..1587 /dbxref="REBASE:Xho I"
misc_binding		1605..1610 /dbxref="REBASE:EcoRV"
misc_binding		1621..1628 /dbxref="REBASE:NotI"
misc_binding		1626..1632 /dbxref="REBASE:Xho I"
misc_binding		1640..1645 /dbxref="REBASE:XbaI"
misc_binding		1646..1651 /dbxref="REBASE:Apal"
Promoter		1659..1677 /gene="T7 prom"
Reporter		1681..1840 /gene="lacZ_a reporter"
Rep_Origin		1858..2164 /gene="f1 origin"
Promoter		2475..2524 /gene="NEOKAN prom"
misc_binding		2577..2582 /dbxref="REBASE:BglII"
misc_binding		2582..2587 /dbxref="REBASE:BclI"
Marker		2616..3404 /gene="NTP II marker"
Marker		3425..4285 /gene="amp marker"
Rep_Origin		4440..5059 /gene="pBR322 origin"
BASE COUNT	1162 a 1456 c 1398 g 1209 t 0 others	
ORIGIN	<pre> 1 agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc 61 acgacaggtt tcccgactgg aaaggcgccaa gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagtttagc 121 tcactcatTA ggcaccccaag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa </pre>	

181 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttg
 241 gtaccgagct cggtatccact agtaacggcc gccagtgtgc tggatttcgc ctttgtcgac
 301 cctgagcttc aaagaagaag ctcatcagag tggactgtc tgcggagg gggtggagcg
 361 cggggggggg gggcggttgg aatgagtgt agaccctcaa cagcttcca gctctgggtc
 421 gtccccggat cagcccttc ctttccat cgctgttca ccttttgc cttcccccct
 481 gcatccctaa acccccattcc tctcccgcc tccctccacc cccaaccccg acgcccgggg
 541 ctgcccgtgt agccccgggt gtagaccgag cccggaaagaa agtggtcagt tgaccaggct
 601 gagtgatat cacctgttt cgttccagc catgccttgc gttcaggcgc agtatgggtc
 661 ctgcctcaa ggagccagcc cegttctca gagctacagt taccacttt cgggagaata
 721 cagctccat ttcttaactc cagagttgt caagtttgc atggacctca ccaacactga
 781 aattactgcc accacttctc tccccagctt cagttacctt atggacaact acagcacagg
 841 ctacgacgtc aagccacctt gtttacca aatgcccctg tccggacagc agtccctccat
 901 taaggtagaa gacattcaga tgcacaacta ccagcaacac agccacctgc cccctcagtc
 961 cgaggagatg atgcccacaca ggggtcggt ttactacaag cccttgcgc ccccgacacc
 1021 cagcaccccg agtttccagg tgcagcatag cccgatgtgg gacgatccgg gtccttc
 1081 caactttccac cagaactacg tggccactac gcatatgatc gagcagagga agacacctgt
 1141 ctccccgtcg tcaacttttc ctttaagca gtcgcccccg ggcacttcgt tgcctagctg
 1201 ccagatgcgc ttgcacgggc ctctgcacgt ccccatgaaac cccggagcccg cggcagcca
 1261 ccacgtatgt gatggcaga ctttgcgcgt gccaacccc attcgaaccc cggcatccat
 1321 gggcttcccg ggcctgcaga tggccacgc atcgcagttg cttgacacgc aggtgcctc
 1381 gcccgcgtcc cggggctctc cttccaatga gggctgtgc gctgttgcgt gtgacaacgc
 1441 ggcctgtcag cactacgggt ttcgcacttgc tgagggtctgc aaagtttct ttaaggtgag
 1501 caagacaggg cggaggtggc aggtacggc ctttataactt gagacccagc agtgcaccc
 1561 caccttccgg tccguagccc cgctcgagaa gggcaattt tgcagatattt catcacactg
 1621 gcccgcgtc gacatgcac ttagaggccc caattgcgc tatagtgatc cgtattacaa
 1681 ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctggaaaac cttggcgta cccaaacttta
 1741 tgccttgca gacatcccc ctttgcacag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga
 1801 tgccttcc caacagtgc gacgcctgaa tggcaatgg acgcgcctg tagcggcgca
 1861 ttaagcgccgg cgggtgtggt gttacgcgc acgtgtaccc ctacacttgc cagccctta
 1921 ggcgcgttc ctttgcgtt cttcccttcc ttttcgcaca ctttgcgcgg ctttcccg
 1981 caagctctaa atcgggggct cccttaggg ttccgattta gtcgttacg gcacctcgac
 2041 cccaaaaaac ttgatttaggg tgcgttca cgtatgtggc catgccttgc atagacgggt
 2101 ttgcgcctt tgcgttggc gtccacgttc ttaatagt gactttgtt ccaaacttgg
 2161 acaacactca accctatctc ggtctattt tttgattttt aaggatttt gccgatttc
 2221 gcttattggc taaaaatgt gctgattttaa caaaaattt acgcaattt taacaaaatt
 2281 caggcgccaa gggctgtcaa aggaagcgga acacgttagaa agccagtcgc cagaaacgg
 2341 gctgaccccg gatgaatgtc agtactggg ctatctggc aaggaaaac gcaagcgca
 2401 agagaaagca ggtagcttc agtggctta catggcgata gtcactgg ggggtttat
 2461 ggacagcaag cgaaccggaa ttgcacgtg gggcccccgc tggtaagggtt gggaaaggcc
 2521 gcaaagtaaa ctggatggc ttcttgcgc caaggatctg atggcgccagg gatcaagat
 2581 ctgatcaaga gacaggatga gatgtttc gcatgattt acaagatgg ttgcacgc
 2641 gttctccgc cgcttgggtt gagaggtat tcggctatga ctggcacaatc cagacaatcg
 2701 gctgtctga tgcgcgtt ttcggctgt cagcgcagg ggcgcgggtt cttttgtca
 2761 agaccgaccc gtcgggtgcct gtaatgaaac tgcaggacga ggcagcgcgg ctatctggc
 2821 tggccacgac gggcggttcc tgcgcacgtg tgcgtacgt gtcactgaa gggggaaagg
 2881 actggctgtc atggggcgaa gtcgcggggc agatcttc gtcatccac cttgtccctg
 2941 ccgagaaagt atccatcatg gtcgtgcac tgcggcggtt gtcatacgctt gatccggcta
 3001 cttgcgcatt cgaccaccaa gcaaaacatc gatcgacgc agcactactt cggatggaa
 3061 ccggcttgcgt cgtcaggat gatctggacg aagagcatca gggctcgcc cccggcaac
 3121 tggccgcac gtcaggcg cgcaccccg acggcgagg tgcgtcgat acccatggcg
 3181 atgcctgtt gccgaatattt atggggaaa atggccgtt ttctggattt atgcactgt
 3241 gcccgcgtgg tggcgccggc cgctatcagg acatagcggtt ggcgtacccgt gatattgt
 3301 aagagcttgg cggcgaaatgg gtcgacccgt tccctgtgtt acgtgttac gccgcctcc
 3361 attcgcacgc catgccttc tatgccttgc tgcacgtt gtttgcatt gaaaaaggaa
 3421 gagttatgtt atcaacatt tccgtgtcgc ctttattccc tttttgcgg cttttgc
 3481 tccgtttt gtcaccccg aaacgtgtt gaaagtaaaa gatgtgttac atcgttgg
 3541 tgcacgcgtt gtttacatcg aactggatctt caacacgcgtt aagatccctt gatatttgc

3601 cccccaaagaa cgaaaaatccaa tgatgagcac tttaaagtt ctgctatgtg ggcggatt
3661 atccccgtatt gacgcccggc aagacaact cggcgccgc atacactatt ctcagaatga
3721 cttggtttag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga
3781 attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac
3841 gatcgaggaga ccgaaggagc taaccgctt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg
3901 ctttgatcgt tggaaccgg agctaatgaa agccatacca aacgacgagc gtgacaccac
3961 gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactattt actggcgaac tacttactt
4021 agcttcccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct
4081 ggcgcggcc ctccggctg gctggtttat tgctgataaaa tctggagccg gtgagcgtgg
4141 gtctcgccgt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgttagttat
4201 ctacacgacg gggagtcagg caactatgaa tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg
4261 tgcctcaactg attaaggcatt ggttaactgtc agaccaagtt tactatata tacttttagat
4321 tgataaaaa cttcattttt aattaaaaag gatcttagtg aagatcctt ttgataatct
4381 catgacccaaa atcccttaac gtgagtttc gttccactgaa gcgtcagacc ccgtagaaaa
4441 gatcaaagga tcttctttagt atcctttttt tctgcgcgtt atctgctgtc tgcaaaacaaa
4501 aaaaccacccg ctaccagccg tggttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctcttttcc
4561 gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaataact gttcttctag ttagccgtt
4621 gttaggccac cacttcaaga actctgtacg accgcctaca tacctcgctc tgctaattct
4681 gttaccatgt gctgctgcca gtggcgatata gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg
4741 atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gttctgtca cacagcccg
4801 cttggagcga acgacctaca ccgaacttagt atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc
4861 cacgcttccc gaagggagaa aggccggacag gtatccggta agcggcaggg tcggAACAGG
4921 agagcgcacg agggagctt cagggggaaa cgcctggat ctttatacg tcgtcggtt
4981 tcgcccaccc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg
5041 gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttacg gttcctggcc ttttgcgttcc cttttgcgtca
5101 catgttcttt cctgcgttat cccctgatcc tttggataac cgtattacgg cctttgatgt
5161 agctgataacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gatgcgtga gcgaggaagc
5221 ggaag

//

**Figura 27. Vector pCR/E3**

ANEXO IV

LOCUS	dna	5283 bp				
FEATURES Location/Qualifiers						
Promoter	143..172	/gene="lac prom"				
misc_binding	246..251	/dbxref="REBASE:SacI"				
misc_binding	252..257	/dbxref="REBASE:BamHI"				
misc_binding	293..301	/dbxref="REBASE:Not I"				
other_gene	293..1594	/gene="Exón 2 del gen NURR1"				
misc_binding	415..420	/dbxref="REBASE:HpaI"				
misc_binding	696..701	/dbxref="REBASE:NdeI"				
misc_binding	906..911	/dbxref="REBASE:StuI"				
misc_binding	1154..1159	/dbxref="REBASE:AccI"				
misc_binding	1633..1640	/dbxref="REBASE:Kpn I"				
misc_binding	1663..1668	/dbxref="REBASE:EcoRV"				
misc_binding	1704..1709	/dbxref="REBASE:Apal"				
Promoter	1717..1735	/gene="T7 prom"				
Reporter	1739..1898	/gene="lacZ_a reporter"				
Rep_Origin	1916..2222	/gene="f1 origin"				
Promoter	2533..2582	/gene="NEOKAN prom"				
Marker	2674..3462	/gene="NTP_II marker"				
misc_binding	3231..3236	/dbxref="REBASE:NcoI"				
Marker	3483..4343	/gene="amp marker"				
Rep_Origin	4498..5117	/gene="pBR322 origin"				
BASE COUNT	1261 a	1313 c	1378 g	1331 t	0 others	
ORIGIN	<pre> 1 agcgcccaat acgcaaaccg cctctcccg cgagttggcc gattcattaa tgcagctggc 61 acgacagggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgaggtagc 121 tcactcatta ggcaccccccag gctttacact ttatgtttcc ggctgtatg ttgtgtggaa 181 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagcttg 241 gtaccogagct oggatccact agtaacggcc gccagtgtgc tgaattcgc cttggggccc 301 gcacggttat gaaactgtga catagccacg ggttaatatac cagaacagac atattttcaa 361 gggcgccggc ggatgggggt ggggagataa agcaaaaagtc ctctggtttg tcttgttaac 421 cttctccgct ctttgaagca aagcaagatt gtggaaagaag tgggggggggg gggcgagag 481 gggaggggagc aaaggagagg gtgttcaggt ttctttactt tatcaacaag atcgctatg 541 ctctagaatg ctttgcaagt gggAACATCT gaaaaaaaaa atagcttagga cacaagaatg 601 cttgtccccca gcaagtaggc agcctgtgga aagcattgtg gagaaggtgt ccagtttgct </pre>					

661 gtgctgagaa gtgcttctaa ctttgggcc aatatcatat gcgtaatatt tctttccctc
 721 tgcagttgac ccaagatact cctggtaaag tagagatctc tctcatcacc tctggccat
 781 taaagatgtt gaaaatccag ttctctggag gaacaccaat tcgcttgcc cttaaagatcc
 841 tgtgtgaac caaaagcaat tactaaagct acacacttc tcccacattg gctgttttgt
 901 tgtccaggcc ttgctaacgt ttcttaaggg ttggatctgt atttttttt ttcacggttt
 961 actctcgagt tcttttaact ttcttctcc ttcttaagaga aaagtccact ggactctaag
 1021 agagatatta agaggaagct ttgatgtgtt gtttttccctt taccagact tcttaggttt
 1081 gacataaaagt agaatgacaa aggcccttcc atctacagca aaggggccaa ttcattatat
 1141 tgcgtactat ctggtagact catggataa ttccccaca ggatgcttcc tctgcaggg
 1201 ttacactgg gagatgagcg gcattatctg ctgttttagcc accttgttcc tgcacatttc
 1261 attttaaat gctgttggtt aaagtcttca cactcatttca aagggaaagca cttgaaggc
 1321 ctgctgagtg agtctgcatt tgcccagccc aagtctcggtt gggaaagacat cctgaaacctt
 1381 cctgtgtctg tatttcaggg agatctgacg ggctggattt ccaatagctc ttttttaaaa
 1441 tcttggaaac ttgttcttc gctgaattac gacactgttcc accttaatt tccctogaaaa
 1501 ctccaataac tctgctgaag gtcagtgagc tttatcttcc attaccttcc ctgagttccc
 1561 ccataccctc agaaaaaaca aacaaaacag ggcaacaggaa tcttccagg ccaaccctgt
 1621 gccttatagt cacaggtaac gaggacaagg gogaattctg cagatatcca tcacactggc
 1681 ggcgcgtca gcatgcattt agaggccaa attgccttca tagttagtgcg tattacaatt
 1741 cactggcgtt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcggttacc caacttaatc
 1801 gccttgcaggc acatccccctt ttcgcagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc
 1861 gccccttcca acagtgcgc agcgttgcg acgttgcattt ggcgttgcg gggccgttgc
 1921 aagcgccggc ggtgtgggtt ttacgcgcag cgtgaccgctt acacttgcgc ggcgccttgc
 1981 gcccgccttct ttgcgtttctt tcccttcctt tctgcgcacg ttgcgcgtt ttcgcgttca
 2041 agctctaaat cgggggctcc cttaggggtt cgcatttttgcgtt acctcgaccc
 2101 caaaaaactt gattagggtt atggttcacg tagtgggcac tgcctgtat agacggtttt
 2161 tgccttttgcgtt acgttggagt ccacgttctt taatagtggaa ctcttgcgc acactggaaac
 2221 aacactcaac cctatctgg tctattcttt tgattttataa gggattttgc cgatttcggc
 2281 ctattggta aaaaatggac tgatttaaca aaaatttaac gogaatttttgc acaaaattca
 2341 gggcgcaagg gctgttgcgtt aatggggaaac acgttagaaag ccagtccgc gaaacgggtgc
 2401 tgaccccgaa tgaatgtcag ctactggcgtt atctggacaa gggaaaacgc aagcgcaaaag
 2461 agaaaaggcagg tagcttgcag tggcgttaca tggcgatagc tagactggc ggttttatgg
 2521 acagcaagcg aacccggaaatt gccagctggg ggcgccttgc gtaagggttgg gaaaggccctgc
 2581 aaagtaaact ggttgcgtt cttgcgcacg aggatctgtt ggcgcagggg atcaagatct
 2641 gatcaagaga caggatgagg atcggttgc atgattgac aagatggattt gcaacgcagg
 2701 tctccggccg cttgggttgc gaggcttgc ggcgtatgact gggcacaaca gacaatcgcc
 2761 tgcctgtat cggccgttgc cggcgttgc ggcgcaggggc gcccgggttct ttttgcgttca
 2821 accgacctgt cgggtgcctt gaaatgcgtt caggacgagg cagcgcggcgtt atcggttgc
 2881 gccacgacgg ggttgcgttgc cgcagctgtt ctcgcacgtt tcactgaagc gggaaaggac
 2941 tggctgtat tggcgttgc gtcgttgc gatcttgcgtt catccaccc tgcgttgc
 3001 gagaaatgtt ccatcatggc tgatgcgtt cggcggttgc atacgttgc tccggcttacc
 3061 tgccttgc accaccaagc gaaacatgcg atcgacgttgc cactactgc gatggaaagcc
 3121 ggttgcgttgc atcaggatgtt tctggacgaa gaggatcagg ggctgcgcg acccgaactg
 3181 ttcgcgttgc tcaaggcgccg catgcggcgc ggcgttgc gtcgttgc ccatggcgat
 3241 gctgttgc cgaatatcat ggtggaaat ggcgttgcgtt ctggatttgc cgtactgttgc
 3301 cggctgggttgc tggcgacccg ctatcaggac atagcggttgc ctaccgttgc tattgttgc
 3361 gagcttggcgttgc gcaatggggc tgaccgttgc ctcgttgcgtt acggatcgcc ggcgcggat
 3421 tgcgttgc tgcgttgc tgcgttgcgtt gacgttgcgtt tctgttgc ttttgcgttca
 3481 gtatgtat tcaacatttc cgttgcgttgc ttattccctt ttttgcgttca ttttgcgttca
 3541 ctgttttgc tcaaccggaa acgttgcgttgc aagtttttttttgcgttca ttttgcgttca
 3601 cacgagtggg ttacatgcgtt ctcgttgcgtt acggatcgcc gtcgttgcgtt gatggaaat
 3661 ccgaagaacg ttttccatgcgtt gacgttgcgtt ttttgcgttca ttttgcgttca
 3721 cccgttgcgttgc cggccggccaa gagcaactcg gtcgttgcgtt acactatttgc ttttgcgttca
 3781 tgggttgcgttgc ctcaccgttgc acagaaaacgc atcttgcgttgc ttttgcgttca
 3841 tatgcgttgc tgcgttgcgtt acgttgcgttgc acactgttgc ctttgcgttca
 3901 tggaggacc gaaaggagccgttcc accgttgcgttgc ttttgcgttca ttttgcgttca
 3961 ttgtatgttgc ttttgcgttca ttttgcgttca ttttgcgttca ttttgcgttca
 4021 tgcgttgcgttca ttttgcgttca ttttgcgttca ttttgcgttca ttttgcgttca

4081 cttccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc
 4141 gctggccct tccggctgac tggtttattt ctgataaaatc tggagccgt gacgtgggt
 4201 ctgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct
 4261 acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg
 4321 cctcaactatgat taagcatttg taactgtcag accaagttt ctcataatata ctttagattt
 4381 attaaaact tcatttttaa tttaaaagga tcttagtgaa gatcctttt gataatctca
 4441 tgacccaaat cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaaga
 4501 tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgccgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa
 4561 aaccaccgct accagcggg gtttggc cggatcaaga gctaccaact cttttccoga
 4621 aggttaactgg cttcagcaga ggcagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgttagt
 4681 taggccacca cttcaagaac tctgttagcac cgccatata cctcgctctg ctaatcctgt
 4741 taccagtggc tgctgcccgt ggccataagt cgtgttac cgggttggac tcaagacgat
 4801 agttaccgga taaggcggcag cggtcgggct gaacgggggg ttgtgcaca cagccagct
 4861 tggagcgaac gacccatacc gaaactgagat acctacageg tgagctatga gaaagcggca
 4921 cgcttccoga agggagaag gcccacaggat atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag
 4981 agcgcacgag ggagttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc
 5041 gccacccctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgcc agggggcgg agcctatgga
 5101 aaaacccag caacggggc ttttacggt tcctggcct ttgtgcgcct tttgctcaca
 5161 tggctttcc tgcgttatecc cctgattctg tggataaccg tattaccggc tttgagtgag
 5221 ctgataccgc tcgcccgcagc cgaacgaccc agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg
 5281 aag

//



Figura 28. Esquema del vector pCR/E2

Anexo V

LOCUS dna 8654 bp
 FEATURES Location/Qualifiers
 Promoter 143..172
 /gene="lac prom"
 misc_binding 246..251
 /dbxref="REBASE:SacI"
 misc_binding 293..299
 /dbxref="REBASE:Bgl II"
 other_gene 293..5011
 /gene="Exón 4 al exón 8 del gen NURR1"
 misc_binding 2013..2018
 /dbxref="REBASE:SmaI"
 misc_binding 2013..2018
 /dbxref="REBASE:XmaI"
 misc_binding 2676..2681
 /dbxref="REBASE:StuI"
 misc_binding 5004..5011
 /dbxref="REBASE:Bgl II"
 misc_binding 5034..5039
 /dbxref="REBASE:EcoRV"
 misc_binding 5050..5057
 /dbxref="REBASE:NotI"
 misc_binding 5057..5062
 /dbxref="REBASE:XhoI"
 misc_binding 5069..5074
 /dbxref="REBASE:XbaI"
 misc_binding 5075..5080
 /dbxref="REBASE:Apal"
 Promoter 5088..5106
 /gene="T7 prom"
 Reporter 5110..5269
 /gene="lacZ_a reporter"
 Rep_Origin 5287..5593
 /gene="f1 origin"
 Promoter 5904..5953
 /gene="NEOKAN prom"
 Marker 6045..6833
 /gene="NTP_II marker"
 misc_binding 6602..6607
 /dbxref="REBASE:NcoI"
 Marker 6854..7714
 /gene="amp marker"
 Rep_Origin 7869..8488
 /gene="pBR322 origin"
 BASE COUNT 2277 a 2006 c 2129 g 2242 t 0 others
 ORIGIN
 1 agcgccaa at acgcaa aacccg cctctccccg cgcggttggcc gattcattaa tgca gctggc
 61 acgacagg tt tccc gact gg aaagcgggca gtgagcgc aa cgca attaa gtgagtttagc
 121 tcactcat ta ggcacccca ag getttacact ttatgc tttcc ggetcg ttagtggaa
 181 ttgtgagccgg ataaca attt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gcca agcttg
 241 gtaccgag ct cggttccact agtaac cggcc gccagtgtgc tggaaattcgc ctttagatct
 301 tcagaaa agac tggtagagtc agggtttcat cccccccccc cccgcgc ccc acagcaaccc
 361 gccccccccc cgggctccag cccgaaattt ctggagccag agtggaaaga gggctatttg
 421 catgtgtt tag ggcgtgttctt ccttggttc agtggaaattt gtttggacag agaaccgtgt
 481 ctgagctaac caagtggaa ac agaattccct atggtcaaat taagtgtatct ctttatttcc
 541 ccatcctgat tgaataatct tacat tta aatagagaag gtctccaagg aatgtaaata
 601 atatgaatgc ccacggattt gtat ttaactg agcgtctctt gccccttctc ctggcatata
 661 aaacacagca aggagcggta aggttagctc aatgttaac gctatcaatt ttcttctgt
 721 aaatgccctg gggaggaaaa gggaggaaaa taggaagaaa agaaaaagaa aaggaaagaa
 781 agaaaagaaa aaaaagaaa aaaaagaaa aaaaagaaa aaaaagaaa aaaaagaaa aaaaagaaa
 841 gtgtttatgt ttgttagggaa gggatgcaga tccaaaggccat tttttaaaaa aatgtgtccaa

901 gtttgcgttga ctttgagtga aaaaaataat cattttgggg cctacattct ctccccctac
 961 agcgccacggc gcaaaaaaac gcgaaatatg tgggttttagc aaataaaaaac tgccccagtt
 1021 acaaggcccg ccgaaaatcg tggcgtact gtgggttca gaagtgccta gctgttggga
 1081 tggtaaaga aggttaggtcg aggcaagttt ttgacccccc atttcacgccc cctggaaatgc
 1141 caccagctgc ttgtggactc cggtccctgc cttactcccc acggcccttga ctccaggatt
 1201 ccactgtcaa atgccttcct ctaaaagaag ccacccggcc ctccttttct ttaagtatag
 1261 gacccagttt gaggaaaggta taaaataacc cgccatttat taatgtttct cgtcgtaa
 1321 gtctttaaaaa tcagaggagc cctggaccac cagggtgggc ttcttcact gttccctogg
 1381 ggaggagggc gtgaggcagc tgagtctggg ctcaagggaa cagcgttaac cttttagtta
 1441 ttcccttaca gtgggtcgca cggacagttt aaaagggccgg agagggtgtt taccctcgaa
 1501 gccgaagagc ccacaggatc ccttcctcccc ctcacccccc gtgggtctga tcagtgcct
 1561 cgtcagagcc cacgtcgatt ccaatccggc aatgaccage ctggacttatt ccagggtaag
 1621 aagccgggtgg tggggaaata tcaatcatgt ggacaagcca acaaattgggc aggaccctt
 1681 ccctataaccc agcttagca ccccccact caaggtaaa ggaggaacag cagaatacat
 1741 acttcacaac tttggcagg tttttaggag acaggtgggt ctgtctaaag tacagaccgg
 1801 agaacacacc ggaggggttg aatcttttgt aaccattatt gtccgacagt ccctccagct
 1861 ggggtcttgg agggaaaacc tagacagttt agcccttectt ccaagtctt ctttacgaag
 1921 ttactagaat acatccccct ccccccttgc tttgttgggg ccagggtgtt aaaaggggg
 1981 tggaaaggat ggcaatgggg ggggggggtt tcccccgggtc agggatcaag tggtgcaatt
 2041 ttcttttac tccagctgtt aaaaatgtc aggtttggg cagagggagt gtggccaaac
 2101 ctagtagcga ctgcataattt attaagttt gcaaaaggcc ctcgggtcgca agaccctct
 2161 tgggatttagc atgaaacta cctgtgtcaat ttttttgtt cggataaagact gaaacgttcc
 2221 cagggcttgg tggactgtt ttttagtctgt atggaaatgg taatttacat atttaaagca
 2281 gogacccat agcacccgtcc ctaattgtaa taatttcccc ggaacatota atttccctac
 2341 tggtcagaga gaggttaat ttttataaaa acctgctcc cctactmgaa acgggggttag
 2401 caatttcaacg gtttatataat ttttagagaac ctcataaagt gttttttaaa atgaaattcc
 2461 agttccagggc aaaccctgac tatcagatga gtggagatga taccggacat atccagcagt
 2521 tctacgtatc cctgaccggc tctatggaga tcatacagggttggcagag aagatccctg
 2581 gctttgttgc cctgccccaa gcccggccagg acctgtttt tgaatcagct ttctttagaat
 2641 tattttttctt ggcgttagca tacaggttaat gaatgaggcc tggaggaggg atcagaagta
 2701 aaggaaagga agagaaaagg gttgggggtt gaggcaagat aaaacaaaag caaaagggtaa
 2761 gaaggaaagg agttagccca gaggcttggg tgacccgggttgggttgggtagggtagt
 2821 ttgttattttt atgaaattaa accctttcaaa ggtccacttgg tetacattttt attaactt
 2881 cagaatttag gtgccttca aatccctcat ttattgttcttcaatgttattt atttgttttag
 2941 ttctcttc tctttttc tccccctctt cttttttttt cttttttttt atttgcagggtt ccaaccct
 3001 ggagggtaaa ctcattttt gcaatgggg ggtctgtcac aggttgcattt ggtggcgttgg
 3061 ctttggggaa tggattgtt ccatttttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3121 cgacatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3181 gtgcaggaca cttcccttc cgaacttcctt ctgggtggac cggccatggc ttccctaat
 3241 cgcagatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3301 ttgcatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3361 aaaaaattgtt aaattgttttcaaaatggccatgt tgactttcaat ttttttttttttttttttttt
 3421 ccaactacccgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3481 gctccagcg catttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3541 aaaaaatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3601 ggaaaagaaaa aaaaaataac atccagagggttgggttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3661 agtgtccatgt ttcacccatgt tcccttctgtt agaccccttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3721 aaaaaacaaa acaaaaccaca aaaaaacttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 3781 tggaaaggca ttt
 3841 gtt
 3901 aatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgtatgt
 3961 ac
 4021 ttggcccttta acaagacttc aaagtt
 4081 actaaatgtt gctgggttgg catgaatt
 4141 gtt
 4201 taagtgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4261 att
 4321 agtatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4381 aaaaaatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4441 aaaaaagggca cccatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4501 tggatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4561 aaaaaacttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4621 ccctggaaat tactgagccat ttt
 4681 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4741 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4801 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4861 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4921 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 4981 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5041 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5101 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5161 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5221 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5281 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5341 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5401 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5461 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5521 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5581 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5641 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5701 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5761 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5821 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5881 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 5941 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6001 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6061 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6121 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6181 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6241 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6301 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6361 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6421 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6481 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6541 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6601 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6661 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6721 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6781 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6841 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6901 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 6961 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7021 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7081 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7141 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7201 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7261 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7321 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7381 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7441 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7501 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7561 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7621 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7681 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7741 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7801 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7861 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7921 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 7981 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8041 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8101 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8161 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8221 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8281 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8341 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8401 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8461 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8521 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8581 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8641 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8701 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8761 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8821 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8881 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 8941 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9001 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9061 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9121 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9181 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9241 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9301 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9361 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9421 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9481 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9541 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9601 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9661 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9721 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9781 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9841 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9901 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 9961 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10021 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10081 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10141 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10201 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10261 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10321 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10381 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10441 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10501 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10561 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10621 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10681 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10741 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10801 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10861 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 10921 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11001 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11061 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11121 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11181 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11241 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11301 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11361 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11421 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11481 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11541 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11601 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11661 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11721 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11781 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11841 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11901 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 11961 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12021 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12081 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12141 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12201 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12261 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12321 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12381 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12441 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12501 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12561 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12621 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12681 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12741 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12801 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12861 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 12921 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13001 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13061 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13121 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13181 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13241 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13301 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13361 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13421 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13481 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13541 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13601 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13661 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13721 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13781 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13841 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13901 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 13961 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14021 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14081 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14141 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14201 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14261 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14321 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14381 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14441 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14501 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14561 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
 14621 aaaaaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt

4681 cagttaatat attattttat gtttgagtaa gaattttaat attgccccat tctgttagtat
 4741 ttcttttgcata tattttctgt acggcacatg agatgagtc ctgccttttt ttcttatggtg
 4801 tacgacagt agagatgtcg atttttttt cctgataaaat tcttttttta agaaaagacaa
 4861 tttaatgtt tacaacaata aaccacgtaa atgaacagaa ctctgtctta ttcttgcc
 4921 aggaaaatgtt ttactaaaca acaggatcaa gaaagaggcg aaagtggaga ctgattttgg
 4981 gaggtcactt acaggacatc tgaatagatc tgaggacaag ggcaattct gcagatatec
 5041 atcacactgg cggccgtctg agcatgtcata tagaggccc aattccct atagttagtc
 5101 gtattacaat tcactggccg tcttttaca acgtcggtac tggaaaaacc ctggcggtac
 5161 ccaacttaat cgccttgcag cacatcccc ttgcgcagc tggcgtaata gccaagaggc
 5221 cgcacccat cgccttccc aacagtgcg cagcctgaaat ggcgaatggc cgcgcctgt
 5281 agcggcgcata taagcggggc ggggtgtgggt gttacggcgc gctgtgaccgc tacacttgc
 5341 agcgccttag cgcccgctcc ttgcgttttcc ttcccttctt ttctgcac gttcgccgc
 5401 ttcccccttc aagctctaaa tcgggggctc cctttaggtt ccgttttag tgccttacgg
 5461 cacctcgacc ccaaaaaact tgatttaggtt gatggttcac gtatggggc atcgcctgt
 5521 tagacggttt ttgccttgc gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg acttttgtc
 5581 caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattttt ttgatttata agggatttt
 5641 ccgatttttgcg cctattgtt aaaaaatgtt ctgatttaac aaaaattttt cgcgaatttt
 5701 aacaaaatttcc agggcgcaag ggctgtctaa ggaagcgaa cacttagaaa gccagtcgc
 5761 agaaaacgggtt ctgacccctgg atgaatgtca gctactggc tatctggaca agggaaaacg
 5821 caagcgcaaa gagaaggcag gtatgttgc gtggggcttac atggcgatag cttagactgg
 5881 cggttttatg gacagcaagc gaaaccggaaat tgccagctgg ggcgcctct ggttaagggt
 5941 ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgcgc aagatctga tggcgccagg
 6001 gatcaagatc tgatcaagag acaggatgttgc gatgttttcg catattggaa caagatggat
 6061 tgcacgcagg ttctccggcc gtttttttttgg agaggcttac cggctatgtac tgggcacaaac
 6121 agacaatogg ctgtctgtat gcccggctgt tccggctgtc akgcgcagggg cggccgggttc
 6181 tttttgtcaaa gaccgacctg tccgggttcc tgaatgtactt gcaaggacgg gcaagcgcc
 6241 tatacggtgtt ggcacacgtt ggcgttctt ggcacgtgtt gtcactgttgc
 6301 cgggaaggga ctgggttgcata ttggggcaag tgccggggca ggatcttgc tcatccccacc
 6361 ttgccttgc cggaaaatgtt tccatcatgg ctgatgtcaat ggcggggctg catacgcttgc
 6421 atccggcttac ctgccttgc gaccaccaag cggaaatctgtt gatcgatgttgc
 6481 ggatggaaatc cgggtttgtc gatcaggatg atctggacgtt gggcttgc
 6541 cagccgaatc gttccggcagg ctcaaggccg gcatgtccca gggcgaggat ttcgttgc
 6601 cccatggcgtt tgcctgttgc cggaaatgttca tggggaaaaat tggggctt tctggattca
 6661 tgcactgttgc cgggtttgtt gttggggacc getatcgatggatcat gatcgatgttgc
 6721 atattgttgcg agatgttgc gycgaatggg ctgaccgtt cctgttgc
 6781 cggctcccgat ttcgcacgttgc atgccttct tgcacgttgc ttcgttgc
 6841 aaaaaggaaatc agatgttgc ttcacattt cgggttgc cttttttt tttttgggg
 6901 attttgcctt cctgttttttgc ttcacccaga aacgttgcgaaat aaaaatggatcttgc
 6961 tcagttgggtt gcaacgttgc gttacatgttca actggatcttca aacagcggtt aatgttgc
 7021 gagtttttgc cccgaagaac gttttccat gatgttgcact tttaatgttca tgcgttgc
 7081 cgcggattata tcccgatgttgc acggccggca agacgttgc ggttgcgc ttttttttgc
 7141 tcagaatgttgc ttgggttgc ttcacccatgttca actggatgttca aacagcggtt aatgttgc
 7201 agtaagagaa ttatgttgc ttcacccatgttca actggatgttca aacactgttgc
 7261 tctgacaaatc atccggggatc cggaaaggatc aaccgttttgc ttcacccatgttca
 7321 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7381 tgcacccatgttca atccgttgc ttcacccatgttca
 7441 acttacttca gttccggcc aacatgttca actggatgttca aacactgttgc
 7501 accacttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7561 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7621 cgtatgttca ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7681 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7741 actttagatt gatgttcaat ttcacccatgttca
 7801 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7861 cgtatgttca ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7921 gcaacaaatc aacccacccgc taccacgttgc ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 7981 tccatgttgc aaggttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8041 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8101 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8161 ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8221 acggccatgttca ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8281 agaaaggccgacccatgttca ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8341 cggacccatgttca ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca
 8401 tgcgttgc ttcacccatgttca ggttgcgttgc ttcacccatgttca

8461 gaggctatgg aaaaacgcga gcaacgcggc cttttacgg ttcctggcct tttgctggcc
 8521 tttgtotcac atgttcttgc ctgcgttatac ccctgattat gtggataacc gtattaccgc
 8581 ctttgagtga gctgataaccg ctgcggcgac ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagttag
 8641 cgaggaagcg gaag

//

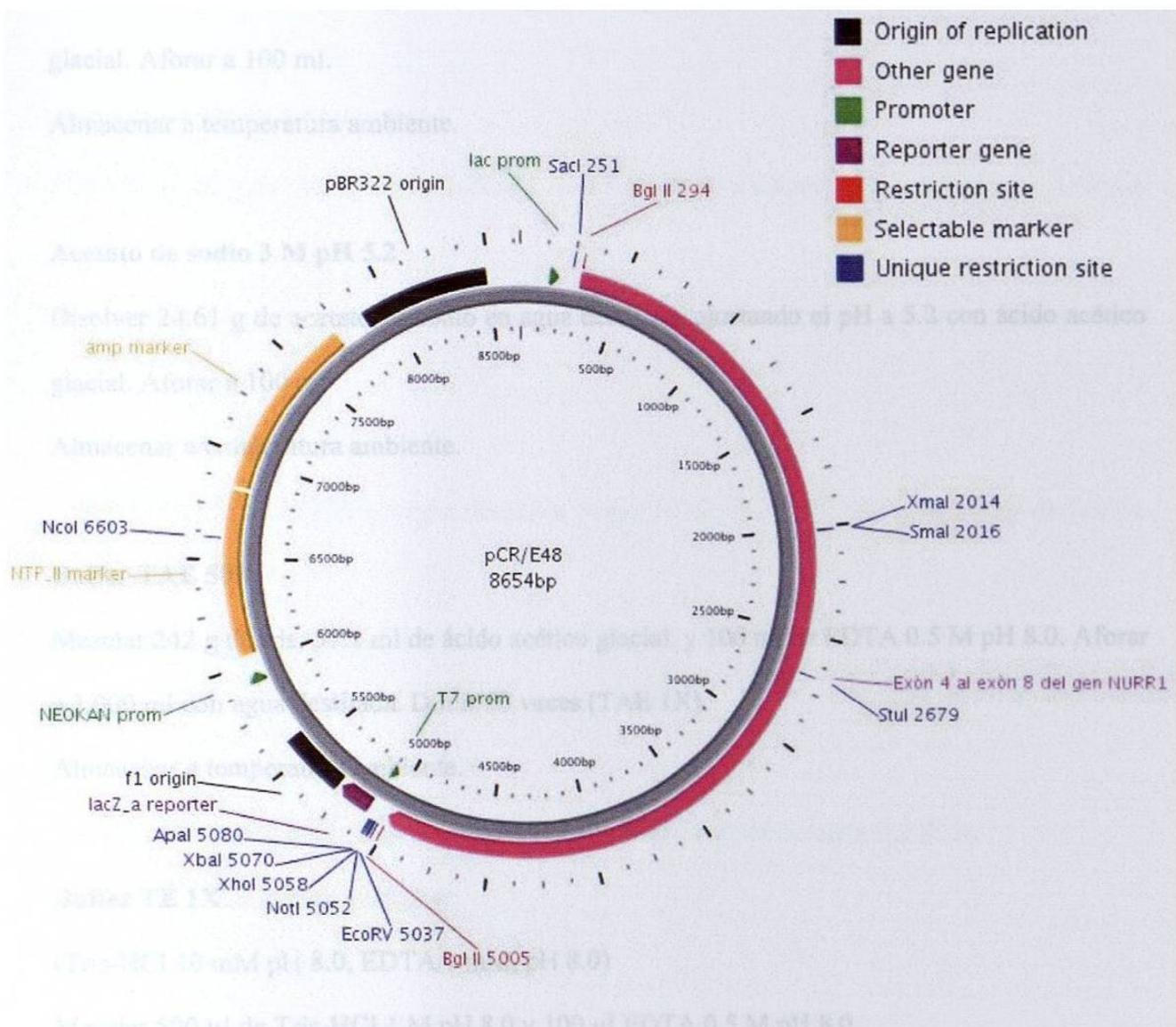


Figura 29. Esquema del vector pCR/E48

Anexo VI**Preparación de soluciones****Acetato de potasio 5 M pH 5.2**

Disolver 49 g de acetato de potasio en agua destilada, ajustando el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Acetato de sodio 3 M pH 5.2

Disolver 24.61 g de acetato de sodio en agua destilada, ajustando el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer TAE 50X

Mezclar 242 g de tris, 57.1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0. Aforar a 1,000 ml con agua destilada. Diluir 50 veces (TAE 1X).

Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer TE 1X

(Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, pH 8.0)

Mezclar 500 µl de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 100 µl EDTA 0.5 M pH 8.0.

Ajustar el pH a 8 y aforar a 50 ml con agua destilada.

Esterilizar por autoclave.

Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer Tris-HCl 1 M pH 6.8

Disolver 7.2 g de tris en agua destilada, ajustando el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 60 ml.

Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Disolver 10.89 g de Tris en agua destilada, ajustando el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 60 ml.

Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 M pH 8.0

Disolver 18.6 g de EDTA en agua destilada, y ajustar el pH a 8.0 con 2 g de perlas de NaOH. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Fosfato de potasio monobásico 1 M

Disolver 135.5 g de fosfato de potasio monobásico en 1,000 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Fosfato de potasio dibásico 1 M

Disolver 173.5 g de fosfato de potasio dibásico en 1,000 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Glucosa 2 M

Disolver 18.02 g de glucosa en 50 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

IPTG (23 mg/ml)

Disolver 238 mg de IPTG en 10 ml de agua destilada estéril.

Esterilizar por filtración (0.22 µm) y almacenar a -20°C.

Jugo azul 6X

(Azul de bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25%, Glicerol 30%)

Mezclar 25 mg de azul de bromofenol y 25 mg de xilencianol con 3 ml de glicerol. Aforar con agua destilada a 10 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Medio LB Agar-Ampicilina

Disolver 6.4 g de LB agar en 200 ml de agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

Enfriar, agregar 200 µl de ampicilina (100 mg/ml), homogenizar y vaciar en cajas de Petri.

Almacenar a 4°C.

Su vida media es de varios meses.

Ribonucleasa A (*RNasa A*)

(Ribonucleasa A 10 mg/ml, Acetato de sodio 0.01 M pH 5.2)

Disolver 10 mg de ribonucleasa A en agua destilada estéril. Agregar 3.33 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Calentar a 99°C por 15 min. Enfriar a temperatura ambiente, ajustar pH añadiendo 0.1 volúmenes (100 μ l) de Tris-HCl 1 M pH 7.4, y aforar a 1 ml. Almacenar a -20°C.

SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar su disolución. Ajustar pH a 7.2 con HCl concentrado y aforar a 100 ml. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución I para Minipreparaciones de Plásmido

(50 mM Glucosa, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0)

Mezclar 1.25 ml de glucosa 2 M, 1 ml de EDTA 0.5 M pH 8, y 1.25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8. Aforar a 50 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución II para Minipreparaciones de Plásmido

(NaOH 0.2 N, SDS 1%)

Mezclar 300 μ l de NaOH 10 M, y 1.5 ml de SDS al 10%. Aforar a 15 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución III para Minipreparaciones de Plásmido

Mezclar 30 ml de acetato de potasio 5 M con 5.75 ml de ácido acético glacial, y aforar con agua destilada a 50 ml. Almacenar a temperatura ambiente.

Tris 1 M

Disolver 121.1 g de tris base en 700 ml de agua destilada.

Ajustar pH con HCl concentrado como sigue:

pH	HCl
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml

Aforar a 1,000 ml con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

X-GAL (40 mg/ml)

Disolver 400 mg de X-GAL en 10 ml de N-N-dimetil-formamida.

Almacenar a -20°C y proteger de la luz.

RESUMEN CURRICULAR

Humberto Rodríguez Rocha

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología

Tesis: Generación de un vector de recombinación homóloga para la inactivación condicional del gen NURR1

Campo de Estudio: Morfología

Datos Personales: Nacido en Vanegas, San Luis Potosí el 8 de Noviembre de 1972, hijo de Humberto Rodríguez Mota y María Rocha Ramírez.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado obtenido de Biólogo, en el 2001.

Experiencia Profesional: Becario del Laboratorio de Histología y Embriología, del Depto. de Zoología de Vertebrados, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de 1999 al 2001. Profesionista de apoyo de la Unidad de Manipulación Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, del 2002 al 2004. Becario en Investigación en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste-IMSS, de Marzo de 2005 a la Fecha.

