UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

CLONACION DE UN PROMOTOR ESPECIFICO DE NEURONAS DOPAMINERGICAS MESENCEFALICAS Y SU ANALISIS FUNCIONAL *in vitro*

POR

M.C. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN MORFOLOGIA

AGOSTO 2006

TD
QP563
.D66
C37
2006
c.1

1080130343

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

CLONACION DE UN PROMOTOR ESPECIFICO DE NEURONAS DOPAMINERGICAS MESENCEFALICAS Y SU ANALISIS FUNCIONAL *in vitro*

POR
M.C. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACION EN MORFOLOGIA

AGOSTO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL *in vitro*

Por

M.C. DIANA LAURA CASTILLO CARRANZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Orientación en Morfología

Agosto, 2006

Rangel Files

El presente trabajo se llevó acabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL *in vitro*

Aprobación de la Tesis:

DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS
Director de Tesis

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Co-Director de Tesis

DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis

DRA. MARIA ESTHELA MORALES PÉREZ
Comisión de Tesis

DR. JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ
Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL *in vitro*

Presentado por la M.C. Diana Laura Castillo Carranza

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucédo Cárdenas y bajo la co-dirección de: Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL

Dra.Odila Saucédo Cárdenas

Director

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Co-Director

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra

Co-Director

DEDICATORIA

A mis padres

Por que siempre han estado conmigo y han tenido la paciencia de soportar
muchas de mis necedades pero sobre todo por que siempre
me han permitido ser yo misma.
Los quiero mucho.

A mis hermanos

Quique y Chuy, por que:
¿Que seria de la vida sin un hermano con quien discutir?,
simplemente gracias por existir.

A mis sobrinos

Chuy, Anaid, Quiquín y la chuky
por tener una tía tan paciente, jajaja.

A mi familia

Muchas gracias.

A mi flaco

Por que está siempre conmigo en las buenas,
en las malas, pero sobre todo por la paciencia
que tiene forzosamente para conmigo.
TQM

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, al CONACYT por la beca proporcionada que me permitió continuar con mis estudios de postgrado.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por aceptarme en el postgrado en Morfología por segunda ocasión y por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por todo el tiempo invertido en mi desarrollo profesional y por su ayuda en las diferentes etapas de la realización de este trabajo.

A la comisión de tesis: Dr. José Carlos Jaime Pérez por sus comentarios siempre alentadores, y a la Dra. María Estela Morales Pérez muchas gracias.

Al Dr. Arturo Chávez Reyes por dejarme fusilar sus reactivos y por toda la ayuda, brindada, mil gracias.

A mis compañeros de Laboratorio: Blanca, Cecy, Maribel, Arnulfo de Zavala, Lalo, Adolfo, Cristian, Laura, Marichu, Julio, Alicia, Vivi, Katy, por todos los gratos momentos que me llevo y que recordare siempre.

Pero sobre todo muchas gracias a aquellos que sin estar involucrados en este trabajo fueron de gran ayuda, Marisela, Carmen, Claudio, Lety e Iram.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL por facilitar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

INDICE

CONTENIDO **PAGINA**

LISTA DE TABLAS i

LISTA DE FIGURAS ii

NOMENCLATURA iii

RESUMEN iv

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1 Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas 2
1.1.1 Genes involucrados en la diferenciación de Neuronas dopaminérgicas Mesencefálicas 3
1.2 Knockout condicional 4
1.3 Sistema Cre/loxP 4
1.3.1 Cre recombinasa 5
1.3.2 Función de Cre recombinasa en el bacteriófago P1 5
1.3.3 LoxP 6
1.3.4 Mecanismo de recombinación 6
1.3.5 Aplicaciones del sistema Cre/loxP 8
1.3.6 Expresión de la enzima Cre recombinasa en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas 10
1.4 Pitx3 10
1.4.1 Organización estructural del gen Pitx3 11
1.4.2 Deleción en la región 5′ del gen Pitx3. 12
1.5 Justificación 14
1.6 Objetivos 15
1.6.1 Objetivo general 15
1.6.2 Objetivos específicos 15
1.7 Estrategia experimental 16

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

2.1 Material 17
2.1.1 Origen de los reactivos 17
2.1.2 Material biológico 18
2.2 Equipo 19
2.3 Métodos 20
2.3.1 Construcción de un vector de expresión de la enzima Cre recombinasa 20
2.3.1.1 Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa. 20
2.3.1.1.1 Digestión con enzimas de restricción 20
2.3.1.1.2 Purificación de fragmentos 20
2.3.1.1.3 Ligación 21
2.3.1.1.4 Transformación 21
2.3.1.1.5 Extracción de ADN plasmídico (minipreparación de plásmidos). 22
2.3.1.1.6 Linearización del vector pBS-Cre con enzimas de restricción 23
2.3.1.1.7 Conversión de los extremos cohesivos en extremos en romos 23
2.3.2.3 Amplificación y clonación de la región 5´ del gen Pitx3 . . . 24
2.3.2.3.1 Extracción de ADN genómico 24
2.3.2.3.2 PCR 25
2.3.2.3.3 Clonación de la región 5´ del gen Pitx3 26
2.3.2.3.4 Extracción de ADN plasmídico a gran escala. 27
2.3.2 Análisis de la actividad promotora del gen Pitx3 *in vitro* 28
2.3.2.1 Cultivo celular 28
2.3.2.2 Transfección de las líneas celulares 28
2.3.2.2.1 Obtención de las células transfectadas con tripsina-EDTA 29
2.3.2.3 Obtención del ARN total de las líneas celulares transfectadas 30
2.3.2.3.1 RT-PCR 31
2.3.2.3.2 Amplificación por PCR de diversos genes a partir del ADNc de las células transfectadas 32
2.3.2.4 Obtención de proteínas de las líneas celulares transfectadas. 33
2.3.2.4.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes 33
2.3.2.4.2 Western blot 34
2.3.2.4.3 Revelado y fijación de la película aurtorradiográfica . . 35
2.3.3 Análisis de la actividad recombinante de la Cre recombinasa *in vitro* . 35
2.3.3.1 Obtención de ADN plasmídico de las líneas celulares transfectadas 35
2.3.3.2 Determinación del evento de recombinación por PCR. . . . 36

CAPITULO III. RESULTADOS

3.1 Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa 37
3.2 Amplificación y clonación de la región 5´ del gen Pitx3. 39
3.3 Expresión específica del gen Pitx3 en la línea celular SH-SY5Y 40
3.4 Análisis funcional del promotor Pitx3 clonado en el vector pPit-cre. 41
3.5 Identificación de la enzima Cre recombinasa por Western blot 43
3.6 Determinación de la actividad de la enzima Cre recombinasa *in vitro* 44
3.6.1 Confirmación de la presencia de los vectores que portan el gen de la Cre-recombinasa (pPit-Cre y pCMV-Cre) en la línea celular SH-SY5Y 44
3.6.2 Recombinación *in vitro* de los sitios loxP del plásmido pLoxA por la enzima Cre recombinasa dirigida por la región promotora del gen Pitx3 46

CAPITULO IV. DISCUSION DE RESULTADOS 48

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIONES
5.1 Conclusiones 55
5.2 Contribuciones 56

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA 57

LISTA DE TABLAS **PAGINA**

Tabla 1. Amplificación de la región 5´ del gen Pitx3: condiciones de reacción. .25

Tabla 2. Programa utilizado en la amplificación de la región 5´ del gen Pitx3 . .26

Tabla 3. RT-PCR: condiciones de reacción. 31

LISTA DE FIGURAS **PAGINA**

Figura 1. Secuencia nucleotídica de un sitio LoxP 6
Figura 2. Reconocimiento de secuencias LoxP por la enzima Cre recombinasa 7
Figura 3. Mecanismo de recombinación de secuencias LoxP 8
Figura 4. Estrategia experimental 16
Figura 5. Digestión enzimática de los vectores pCMV-Cre y pBSKS 37
Figura 6. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pBS-Cre 38
Figura 7. Amplificación de la región 5′ del gen Pitx3 y su sitio de clonación en el vector pBS-Cre linearizado. 39
Figura 8. Caracterización enzimática del plásmido recombinante pPit-Cre . . 40
Figura 9. Expresión del gen Pitx3 en la línea celular SH-SY5Y 41
Figura 10. Expresión del gen de la Cre recombinasa 42
Figura 11. Identificación de la proteína Cre recombinasa mediante análisis de Western Blot. 43
Figura 12. Amplificación del gen de la Cre recombinasa por PCR, a partir del ADN plasmídico recuperado de la transfección de la línea celular SH-SY5Y. 45
Figura 13. Actividad de la enzima Cre recombinasa *in vitro* 47

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	DNA complementario al RNA mensajero
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
ARN	Acido ribonucleico
a.a.	Amino ácidos
μM	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
Taq	DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*
°C	Grados centígrados
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
KO	Knockout
UV	Luz ultravioleta
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mQ	MiliQ
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina hidroxilasa
UTR	No traducible

RESUMEN

Diana Laura Castillo Carranza **Fecha de Graduación: Agosto del 2006**
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio: CLONACIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS Y SU ANÁLISIS FUNCIONAL *in vitro*

Número de páginas: 60 **Candidata para el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología**

Área de estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: El factor de transcripción Nurr1 es importante para la diferenciación y mantenimiento de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Esto quedó demostrado, al ser inactivado mediante recombinación homóloga en un animal murino. Los ratones knockout recién nacidos mueren durante el primer día de vida y aún se desconoce cual de las regiones donde se eliminó la expresión del gen Nurr1 es la responsable del fenotipo obtenido. Para la obtención de un Knockout condicional del gen Nurr1 en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, es necesario desarrollar dos líneas de ratones. Una de ellas que contenga el gen Nurr1 flanqueado por secuencias LoxP y otra que exprese la enzima Cre recombinasa únicamente en el mesencéfalo. En la progenie obtenida de la cruza de ambos ratones, ocurrirá la recombinación de las secuencias LoxP y por lo tanto la eliminación del gen Nurr1 situado entre ellas. Para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa en el mesencéfalo, se utilizó la región 5′ del gen Pitx3. El factor de transcripción Pitx3 se expresa exclusivamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y en ninguna otra región del Sistema Nervioso. La región promotora del gen Pitx3, aún no ha sido delimitada, ni se ha utilizado para dirigir la expresión de algún gen en ensayos *in vitro*. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Obtener un vector para la expresión de la Cre recombinasa bajo la regulación de la posible región promotora del gen *pitx3*. 2) Demostrar la funcionalidad como promotor de la región 5′ del gen *pitx3*. 3) Evaluar la actividad de la enzima Cre recombinasa del vector de expresión construido.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvo un cassette de expresión para la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región 5′ del gen Pitx3 murino. Con la construcción obtenida, pudimos comprobar que la secuencia de 4.1 kb de la región 5′ utilizada, tiene la capacidad de actuar como promotor al permitir la transcripción del gen de la enzima Cre recombinasa. Asimismo, comprobamos que la enzima Cre recombinasa transcrita por el promotor del gen Pitx3, es funcional al recombinar secuencias LoxP presentes en el plásmido pLoxA mediante estudios *in vitro*. Estos resultado demuestran que la construcción obtenida podrá ser utilizada para desarrollar una línea de ratones transgénicos que expresen la enzima Cre recombinasa específicamente en el mesencéfalo.

Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Asesor

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano es uno de los organismos más complejos en cuanto a organización y función. Estructuralmente esta formado por más de 200 diferentes tipos de células, cada una de ellas con un tiempo de vida promedio. Una vez que estas células mueren, son renovadas manteniendo así la homeostasis del tejido al que pertenecen. Sin embargo existe un tipo celular que una vez que han sido diferenciadas en su totalidad, se mantienen presentes durante toda la etapa de vida del individuo sin sufrir recambio. Este tipo de células se conocen como neuronas y pertenecen al tejido nervioso. Normalmente hay una pérdida constante de neuronas durante la vida de un individuo, sin embargo una exposición prolongada de estas células a los efectos tóxicos de diferentes tipos de compuestos químicos y drogas de uso común, pueden provocar disfunción mitocondrial y daño citotóxico, sin excluir factores genéticos que conducen a la pérdida acelerada de este tipo celular.

Por otra parte, el aumento del promedio de vida del hombre ha conducido a un incremento en el número de individuos con enfermedades de tipo degenerativas, siendo el tejido nervioso uno de los más susceptibles a dañarse conforme avanza la edad del individuo. El sistema nervioso tiene como función regular todas las actividades motoras, cognitivas y de conducta de un individuo. La región del sistema nervioso más

susceptible a sufrir muerte neuronal de manera considerable, es la región ventral del mesencéfalo o cerebro medio. En esta región, las neuronas dopaminérgicas están agrupadas en dos núcleos principalmente, el área ventral tegmentaria y la sustancia negra. Esta última recibe su nombre debido a que las neuronas tienen en su citoplasma el pigmento melanina, que les confiere un color parduzco. La función de la melanina se desconoce, pero se piensa que es un producto residual de la síntesis del neurotransmisor dopamina. En el humano la principal enfermedad que se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, es la enfermedad de Parkinson.

1.1 Neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

La principal función de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, se relaciona con el control de movimientos voluntarios, al producir el neurotransmisor dopamina y liberarlo al cuerpo estriado, de tal forma que al morir las neuronas dopaminérgicas se rompe esa comunicación y se presentan los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Los síntomas principales son el temblor en reposo, lentitud de movimientos, afasia y alteraciones posturales entre otras, llegando a la incapacidad total del individuo.

1.1.1 Genes involucrados en la diferenciación de Neuronas dopaminérgicas mesencéfalicas

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, las células progenitoras de células nerviosas se diferencian a fenotipos celulares específicos. Actualmente se conocen varios genes que están involucrados en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas[1-3]. Entre ellos se encuentra el gen TH o tirosina hidroxilasa. Su expresión inicia a los 11.5 días del desarrollo embrionario en el ratón y su función esta implicada en la síntesis del neurotransmisor dopamina[4]. El gen Pitx3 es un factor de transcripción que se une a la región promotora del gen TH y lo transcribe[5, 6]. Pitx3 comienza a expresarse en precursores dopaminérgicos mesencefálicos y en el cristalino de embriones de ratón. Su expresión inicia a los 11 días del desarrollo embrionario del ratón y se mantiene hasta la etapa adulta[7].

Otro gen involucrado en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas es el gen Nurr1, un factor de transcripción que se expresa a los 10.5 días del desarrollo embrionario de ratón[8, 9] y cuya función aún no es completamente entendida. Se considera que la expresión del gen Nurr1 es básica para que las células adquieran un fenotipo dopaminérgico ya que su inactivación en ratones, provocó la falta de expresión de marcadores dopaminérgicos y muerte celular por apoptosis en la región ventral del mesencéfalo[10-12]. A pesar de que el gen Nurr1 se expresa en varias regiones del sistema nervioso central, únicamente la región ventral del mesencéfalo fue afectada. Las neuronas que mueren en el knockout Nurr1, son las mismas que se pierden en los

pacientes con enfermedad de Parkinson, por ello el KO Nurr1 se consideró como un posible modelo animal de dicha enfermedad. A partir de ese momento el KO Nurr1 ha sido ampliamente utilizado en investigación para determinar la base molecular que conduce a la muerte neuronal, con la finalidad de poder relacionarlo de forma directa con la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, para poder determinar el impacto del gen Nurr1 específicamente en el mesencéfalo es importante eliminar de forma específica la expresión del gen Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.

1.2 Knockout condicional

Este tipo de estrategias han sido utilizadas desde principios de los 90´s cuando se desarrolló una nueva tecnología de transgénicos en ratones, que permite controlar la expresión génica en tiempo y espacio[13, 14]. Donde el encendido o apagado de un gen es condicionado por un estímulo específico y por lo tanto hace posible determinar la función de un gen letal en la etapa embrionaria, en animales adultos. Para realizar esta técnica se requiere de dos sitios de recombinación específicos flanqueando el gen que se desea eliminar y la expresión de una recombinasa en el tejido ó en las células donde se desea ocurra la deleción, a este sistema se le conoce como Cre/LoxP.

1.3 Sistema Cre/LoxP

El sistema Cre/LoxP fue descubierto en 1984[15-17], pero a finales de los 80´s y principios de los 90´s se determinó que podía funcionar en células eucariotas en

cultivo[18]. El sistema tiene la ventaja de no requerir cofactores o secuencias adicionales para que ocurra la recombinación. Los únicos elementos requeridos son: la enzima de recombinación, Cre recombinasa y dos sitios de reconocimiento llamados LoxP[19].

1.3.1 Cre recombinasa

La enzima Cre recombinasa fue aislada del bacteriófago P1. Es una topoisomerasa tipo 1 que pertenece a la familia de integrasas de recombinación sitio específico. La enzima de 38 kDa, esta formada por dos dominios unidos por una secuencia corta aminoacídica. El dominio del amino terminal contiene 5 hélices alfa. El dominio del carboxi terminal es principalmente helicoidal y contiene el sitio activo. Este último contiene tres residuos catalíticos conservados, la arginina, histidina, arginina[20, 21].

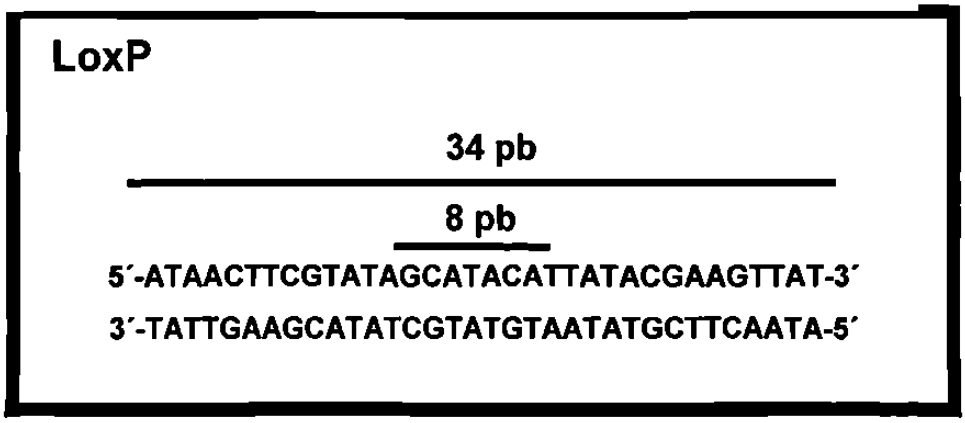
1.3.2 Función de Cre recombinasa en el bacteriófago P1

Los bacteriófagos para su reproducción requieren de células hospederas. Cuando el bacteriófago P1, infecta una célula, integra su material genético en el ADN del hospedero y utiliza la maquinaria transcripcional de la célula infectada para su replicación. El genoma del fago contiene un sitio LoxP, de tal forma que cuando se produce una duplicación del genoma del fago, la enzima reconoce dos sitios LoxP y los recombina eliminando una de las copias del genoma del fago (región situada entre los dos secuencias LoxP), de esa manera mantiene una copia del fago durante la etapa lisogénica asegurando con esto la supervivencia del bacteriófago.

1.3.3 LoxP

Un sitio LoxP es una secuencia de 34 pb. La región central del sitio LoxP es asimétrica, mide 8 pb, y esta flanqueada por dos secuencias palindrómicas (repeticiones invertidas) de 13 pb. El centro asimétrico define la orientación de la secuencia LoxP[22, 23].

Figura 1. Secuencia nucleotídica de un sitio loxP

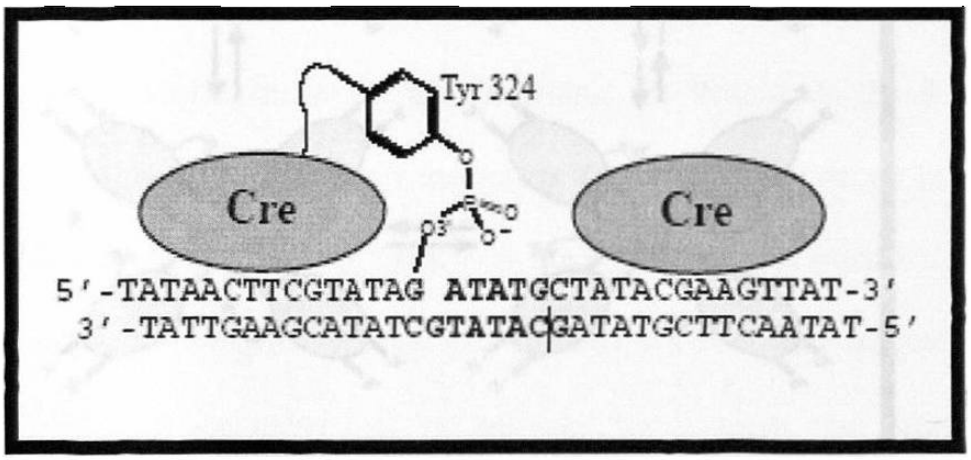


1.3.4 Mecanismo de recombinación

Para que ocurra la recombinación deben existir al menos dos sitios LoxP flanqueando la secuencia de interés. Una sola molécula de la enzima Cre recombinasa se une a cada una de las mitades palindrómicas de un sitio LoxP. Por lo que en cada sitio LoxP se unen 2 moléculas de la enzima Cre recombinasa. En consecuencia, en el momento de la recombinación de los dos sitios LoxP, se forma un tetrámero con las cuatro moléculas de la Cre recombinasa. En cada uno de los sitios LoxP, una enzima

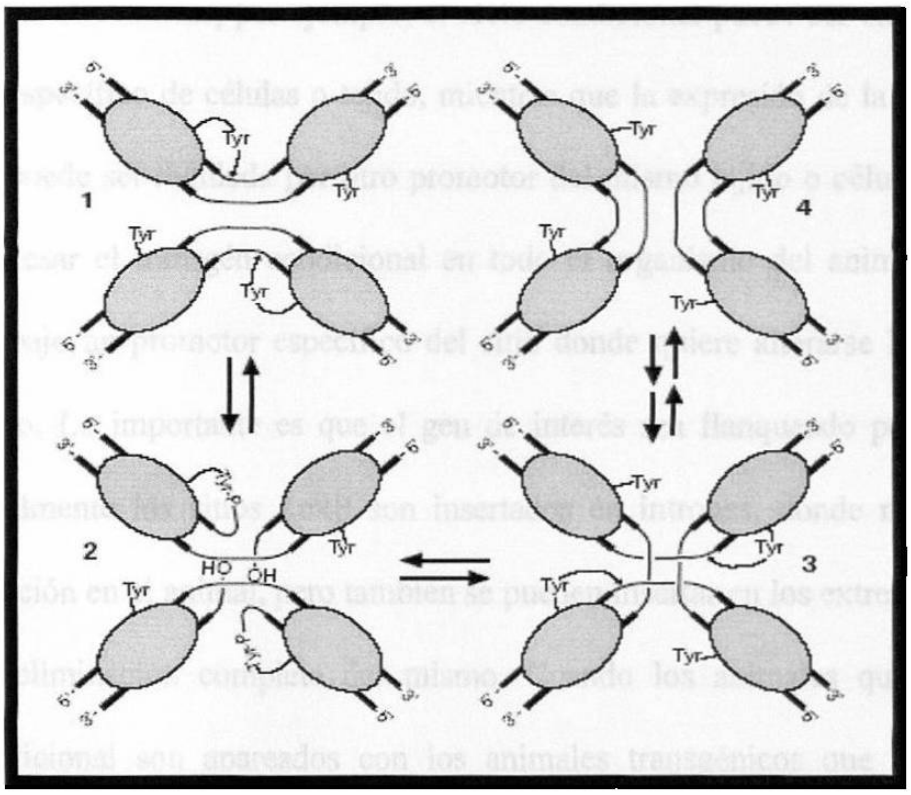
corta el enlace fosfato entre la guanina y citosina (bases adyacentes) del centro asimétrico del LoxP en dirección 5′ a 3′ en una de las cadenas complementarias de ADN. En la otra cadena complementaria y opuesta, la ruptura ocurre entre la primera adenina y timina (adyacentes) del centro asimétrico del sitio LoxP.

Figura 2. Reconocimiento de secuencias LoxP por la enzima Cre recombinasa



El mecanismo por el cual la enzima rompe el ADN entre las bases nucleotídicas, es el siguiente: el aminoácido tirosina del sitio activo de la Cre recombinasa, se une al oxígeno 3′ del enlace fosfato entre las bases GC y AT respectivamente. Entonces los grupos hidroxilo 5′ liberados en el rompimiento del enlace, forman un nuevo enlace fosfodiester con el fosfato de la tirosina del otro sitio LoxP, recombinando de esta forma ambos sitios. Como el rompimiento ocurre en cadenas opuestas en una doble hélice de ADN, el sito LoxP queda dividido a la mitad pero con extremos cohesivos. En el momento de la recombinación la cadena de ADN entre los dos sitios LoxP, se dobla formando un asa, permitiendo que cada mitad de un sitio LoxP reacciona con una mitad del otro sitio LoxP[24].

Figura 3. Mecanismo de recombinación de secuencias LoxP



De esta manera se elimina cualquier secuencia de ADN situada entre ambos sitios. Cuando las secuencias LoxP están en la misma dirección, ocurre una deleción mediada por la enzima Cre recombinasa. Cuando los sitios LoxP están en direcciones opuestas la enzima invierte la secuencia situada entre ellos.

1.3.5 Aplicaciones del sistema Cre/LoxP

Este sistema ha sido ampliamente utilizado tanto en ensayos *in vitro* como en sistemas *in vivo*. En transgénicos se utiliza para eliminar de forma específica un gen en

una sola región sin alterar la expresión del gen blanco en el resto del animal y se le conoce como "knockout" condicional. Para producir un knockout condicional pueden utilizarse varias alternativas, por ejemplo, el alelo condicional puede ser expresado por un promotor específico de células o tejido, mientras que la expresión de la enzima Cre recombinasa puede ser regulada por otro promotor del mismo tejido o célula. También se puede expresar el transgén condicional en todo el organismo del animal y la Cre recombinasa bajo un promotor específico del sitio donde quiere alterarse la expresión del gen blanco. Lo importante es que el gen de interés sea flanqueado por los sitios LoxP. Generalmente los sitios LoxP son insertados en intrones, donde no producen ninguna alteración en el animal, pero también se pueden insertar en los extremos del gen e inducir la eliminación completa del mismo. Cuando los animales que portan el transgén condicional son apareados con los animales transgénicos que expresan la enzima Cre recombinasa en un tejido particular, en la progenie de esa cruza ocurre la deleción, inversión ó translocación de material genético en el sitio donde la enzima Cre recombinasa sea producida.

El rango de corte de la Cre recombinasa es sorprendentemente grande, logrando eliminar regiones de hasta 400 kb, lo que hace que el sistema Cre/LoxP sea una herramienta importante en el campo de la investigación biomédica[25, 26]. Lo más interesante del sistema Cre/LoxP es que se puede eliminar un gen en un tejido específico aunque ese gen se exprese en muchas regiones de forma normal. Para lograr esto es importante utilizar la región promotora de un gen específico del sitio donde se desea eliminar el gen blanco para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa. Por

ejemplo, actualmente no existe un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, donde pueda desarrollarse la muerte de neuronas dopaminérgicas de manera progresiva. Sin embargo este tipo de estrategia representa una alternativa interesante.

1.3.6 Expresión de la enzima Cre recombinasa en neuronas dopaminérgicas mesencéfalicas

Para poder dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa específicamente en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, es necesario utilizar la región promotora de un gen que se exprese únicamente en este tipo celular. En el mesencéfalo se expresan varios genes, entre ellos, el gen Nurr1, TH, Sonic hedgehog, AADH, forskolin, y Limx1b entre otros[2, 27-29]. Sin embargo cada uno de ellos se expresa en otras regiones del sistema nervioso central. Pitx3 es el único gen que se expresa en la región ventral mesencefálica a nivel del sistema nervioso central. Por lo que, la región promotora del gen Pitx3 puede utilizarse para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa de manera específica en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ratón.

1.4 Pitx3

El gen Pitx3 pertenece a la familia de factores de transcripción y genes homeóticos Pitx. Otros miembros de esta familia son los genes Pitx1 y Pitx2. Ambos genes se expresan en la hipófisis, de allí deriva su nombre "pit-x"(**pit**uitary homeobox)[30]. El homeodominio de estos genes es altamente conservado y difiere en uno

o dos aminoácidos. Inicialmente se pensó que al igual que los miembros de su familia se expresaba en la hipófisis, sin embargo no fue así. La expresión de Pitx3 se localizó en el sistema dopaminérgico, específicamente en la región ventral del mesencéfalo y posteriormente se descubrió que también se expresa en el cristalino.

1.4.1 Organización estructural del gen Pitx3

El gen Pitx3 mide 12.6 kb y está organizado en 4 exones y 3 intrones. Los exones miden 125, 129, 210 y 927 pb respectivamente. Los intrones son de 10729, 196 y 379 pb respectivamente. El homeodominio es interrumpido por un intrón en la posición 46. El codón de inicio de la traducción esta situado en el exón 2[31]. En la región 5′ del gen, situada antes del punto de inicio de transcripción se localizaron las cajas TATA y la caja CAAT en la posición -86 a -80 y -205 a -200, así como algunos dominios de unión para factores de transcripción relacionados con el desarrollo del cristalino y la formación de la región cráneo-facial, entre ellos el de las proteínas AP-2 y Maf. Aunque en la región 5′ del gen Pitx3 ya se han identificado secuencias propias de un promotor, la región promotora del mismo aún no ha sido delimitada. El gen Pitx3 es flanqueado por dos genes. En su región 5′ UTR se localiza la región promotora del gen Gbf1, situado a 4.2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen Pitx3. Ambos genes posiblemente tienen en común parte de sus secuencias promotoras. En la región 3′ del gen Pitx3 se localiza el gen Cig30 de quien al menos 10 nucleótidos de la región 3′ UTR se traslapan con la secuencia del gen Pitx3[32].

1.4.2 Deleción en la región 5′ del gen Pitx3

El locus del gen Pitx3 se encontró en el cromosoma 19 del ratón, cerca de una región previamente identificada, cuya mutación provoca alteraciones morfológicas en ratones. El fenotipo de esos ratones conocidos como "aphakia" se caracteriza por alteraciones oculares durante el desarrollo embrionario. Posterior al nacimiento los ratones presentan ojos pequeños con ausencia del cristalino y párpados unidos[31]. En ese momento aún no se había determinado que gen o genes producían tales alteraciones, por lo que al identificar el locus del gen Pitx3 cercano a esa región se pensó que el gen podría estar involucrado en el fenotipo de los ratones aphakia. Cuando se analizó la secuencia codificante del gen Pitx3 en el genoma de los ratones aphakia no se encontró ninguna alteración. Sin embargo al analizar la región 5′ UTR se encontró una deleción de 652 pb situada a -2.5 kb del punto de inicio de la transcripción[33, 34]. Posteriormente se encontró que los ratones aphakia también presentaban la pérdida del exón 1[33]. En los ratones pudieron observar que las alteraciones no estaban restringidas al ojo sino que también había una disminución considerable del número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo[35-38]. Mostrando con ello que el gen Pitx3 y su región 5′ UTR son esenciales en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas a nivel mesencefálico.

Por lo tanto la región 5′ del gen Pitx3, es un candidato ideal para dirigir la expresión de la enzima Cre recombinasa en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. De tal forma que mediante técnicas de ingeniería genética, hemos obtenido un cassette

de expresión de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de la región promotora del gen Pitx3. Con la construcción obtenida, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la actividad promotora de la región 5′ del gen Pitx3 y la actividad de la enzima Cre recombinasa. Posteriormente la construcción será utilizada para desarrollar un ratón transgénico que exprese la enzima Cre recombinasa en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La expresión iniciará a los 11 días del desarrollo embrionario y su expresión se mantendrá en el ratón adulto. Con el transgénico que se obtenga podrán inactivarse en las células donde se exprese la enzima Cre recombinasa, cualquier gen o secuencia flanqueada por sitios LoxP del genoma de cualquier ratón transgénico.

Es importante mencionar que este trabajo forma parte de un proyecto mayor que tiene como meta determinar el efecto de la inactivación condicional del gen Nurr1 específicamente en la región ventral del mesencéfalo, sin alterar la expresión del gen Nurr1 en otras regiones del sistema nervioso central. Con ello podremos relacionar, si la muerte de los ratones KO Nurr1 es provocada por la falta de expresión del gen Nurr1 únicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

1.4 Justificación

El gen Nurr1 se expresa en diversas regiones del SNC. Su inactivación en ratones provocó la muerte de los knockout Nurr1 durante el primer día de vida. En ellos, se encontraron alteraciones morfológicas en la región ventral mesencefálica, caracterizadas por la falta de neuronas dopaminérgicas y muerte neuronal, sin alterar los demás sitios donde también se expresa el gen Nurr1.

Debido a que solo la región ventral mesencefálica fue afectada, es de gran interés obtener un modelo animal condicional donde únicamente se elimine la expresión del gen Nurr1 en la región afectada. Sin embargo para obtenerlo, es indispensable desarrollar dos ratones transgénicos: uno de ellos, que porten la secuencia del gen Nurr1 flanqueada por sitios LoxP y otro ratón que exprese la enzima Cre recombinasa específicamente en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Por ello este trabajo consintió en construir un vector de expresión que contiene la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa bajo la regulación de un promotor específico del mesencéfalo y demostrar su actividad *in vitro*.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Clonación de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y su análisis funcional *in vitro.*

1.5.2 Objetivo específicos

1. Obtener un vector para la expresión de la Cre recombinasa bajo la regulación de la posible región promotora del gen *pitx3.*
2. Demostrar la funcionalidad como promotor de la región 5′ del gen *pitx3.*
3. Evaluar la actividad de la enzima Cre recombinasa del vector de expresión construido.

1.6 Estrategia experimental

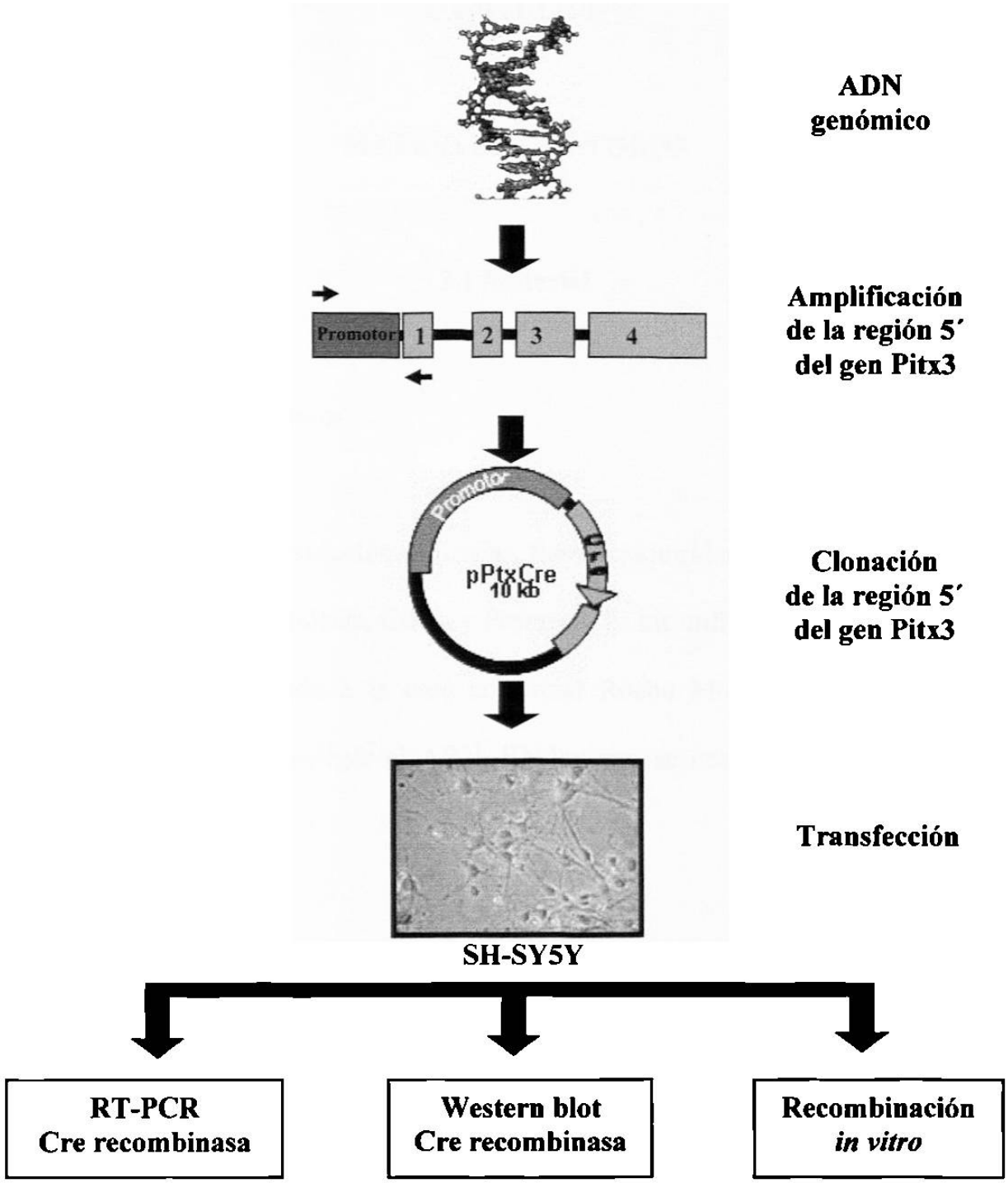


Figura 4. Estrategia experimental. Se muestran las etapas involucradas en el desarrollo de la investigación, las cuales consistieron en: a) Amplificación y clonación de la región 5′ del gen Pitx3 a partir de ADN genómico de ratón. b) Transfección de la línea celular SH-SY5Y con la construcción obtenida. c) Detección de la enzima Cre recombinasa a nivel de ARNm y proteína, por RT-PCR y western blot respectivamente. d) Determinación de la funcionalidad de la enzima Cre recombinasa mediante recombinación *in vitro* por PCR.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1 Material

2.1.1 Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción utilizadas, fueron adquiridas de las casas comerciales Roche Molecular Biochemicals, Gibco y Promega. El kit utilizado para la transcripción inversa-PCR fue comprado a la casa comercial Roche Molecular Biochemicals. El reactivo utilizado para proteger el ARN, RNAsa zap se compró a la casa comercial Ambion.

La transfección se realizó con el reactivo lipofectamina-2000 de la casa comercial Invitrogen. Los reactivos y medios para el cultivo de células, fueron: DMEM, Opti-MEM, Tripsina-EDTA, Ampicilina/Estreptomicina 1X, suero fetal bovino y buffer de fosfatos 1X, adquiridos de la casa comercial Gibco.

El anticuerpo anti-Cre recombinasa de ratón fue adquirido de Chemicon. El anticuerpo anti-β-actina fue adquirido de la casa comercial MP Biomedicals. Para realizar el western blot se utilizó el kit de Promega.

Los reactivos empleados para la preparación de geles como: agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol se adquirieron de las casas comerciales DIFCO Laboratories, Sigma Chemical y Merk, respectivamente.

Los reactivos utilizados en la obtención de ADN genómico y plasmídico, como el acetato de sodio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, trizma, fenol, cloroformo todos ellos de Sigma-Aldrich. Así como cloruro de magnesio, β-mercaptoetanol, alcohol etílico absoluto, metanol y cloroformo fueron adquiridos de CTR distribuidores.

2.1.2 Material biológico

Las células SH-SY5Y utilizadas en este trabajo, fueron proporcionados por el Dr. Weidong Lee del Departamento de Neurología del Baylor College of Medicine de Houston, Texas, E.U.A. Las células MCF-7, fueron proporcionadas por el Dr. Arturo Chávez Reyes del departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

Los ratones de la cepa 129Sv fueron adquiridos del laboratorio Jackson por la Dra. Odila Saucedo Cárdenas.

Los plásmidos utilizados así como la cepa de bacterias de *Escherichia coli* DH5α pertenecen al departamento de Genética molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste IMSS.

2.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizaron: placa de calentamiento con agitador magnético TROEMNER, horno de temperatura con rango de 30 a 100°C, potenciómetro Thermo Orion 410A, balanza analítica AND GR120, transiluminador UV/luz Bio-vision Spectroline, espectrofotómetro, centrífugas refrigeradas Sorvall y Damon, termociclador (Minicycler Beckman), vortex marca Lab-line, incubadora Caisa, Microcentrífuga Hermle, fuente de poder EC 105, mini cámara para electroforesis horizontal, juego de pipetas calibradas Gilson de 20, 200 y 1000 μL, balanza analítica OHAUS, baños de agua con control de temperatura, incubadora con agitación mecánica marca New Brunsweck Scientific.

El equipo utilizado para el análisis de datos esta formado por computadoras Compaq Presario M2000 y Toshiba. Los procesadores de texto utilizados fueron: Microsoft word 2000, procesadores gráficos Microsoft Power Point, Microsoft Photo Editor y Scanner Visioner.

2.3 Métodos

2.3.1 Construcción de un vector de expresión de la enzima Cre recombinasa

2.3.1.1 Subclonación del gen de la enzima Cre recombinasa.

2.3.1.1.1 Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones se realizaron bajo condiciones óptimas sugeridas por las casas comerciales. Se utilizaron 10 μg del vector pBS185 (CMV-cre) conteniendo la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa, así como 10 μg del vector pBSKS, ambos fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *Xho*I utilizando una unidad de enzima por cada μg de ADN plasmídico y 5μL de buffer multicorte en un volumen total de 50 μL. Los tiempos de incubación fueron de 2 a 12 horas a 37°C.

2.3.1.1.2 Purificación de fragmentos

Los fragmentos obtenido a partir del ADN digerido, se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. La migración se efectuó a 40 volts, durante 3 horas. Las bandas de ADN de interés se cortaron del gel y se recuperaron mediante el kit de purificación de ADN por columna de la marca Qiagen, de la siguiente manera: el fragmento de gel es transferido a un tubo eppendorff de 2 mL e incubado a 50°C por 10

minutos con tres volúmenes de la solución QG. Posteriormente se adicionó un volumen de isopropanol para precipitar el ADN y la muestra fue eluída a través de una columna de intercambio aniónico del mismo kit. La columna se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el eluído y se añadieron a la columna 750 μL de buffer de lavado. Nuevamente se centrifugó la columna por 1 minuto a 12,000 rpm La columna fue colocada en un tubo nuevo y se añadieron a la columna 50 μL de buffer de elusión PE. Se centrifugó 1 minuto a 12 000 rpm y los fragmentos purificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%.

2.3.1.1.3 Ligación

Una vez purificado el fragmento de 2.7 kb que corresponde al gen de la enzima Cre recombinasa y el vector pBSKS, se ligaron empleando para ello 100 ng de DNA totales en una relación 1:3, una unidad de la enzima ADN ligasa y 4 μL de Buffer de ligación 5X en un volumen total de 20 μL. La ligación se incubó a 15°C durante toda la noche.

2.3.1.1.4 Transformación

La transformación se realizó añadiendo 2 μL de ligación a 100 μL de células calcio competentes de la cepa DH5α. Las células se incubaron en hielo durante 1 hora. Inmediatamente después se sometieron a choque térmico al incubarlas un minuto a 42°C, seguido de una incubación en hielo de 2 minutos. Posteriormente se añadieron

400 μL de medio de cultivo LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C en agitación mecánica a 250 rpm durante 1 hora. Se inocularon 100 μL del cultivo en placas de agar LB con ampicilina. Las placas se incubaron invertidas durante toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas fueron procesadas para la obtención del ADN plasmídico.

2.3.1.1.5 Extracción de DNA plasmídico (Mini-preparación de plásmidos).

Las clonas recombinantes obtenidas de las ligaciones fueron procesadas para la obtención de ADN plasmídico utilizando el método de lisis alcalina.

Se inoculó una colonia bacteriana en 3 mL de caldo LB (bactotriptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5-7.0) con 3 μL de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche a 150 rpm El cultivo se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se incubó a –20°C por 5 minutos. Se añadieron 100 μL de solución de lisis I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8), se resuspendió la pastilla por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 μL de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10N, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8 mL de agua), nuevamente se incubó en hielo 5 minutos y se añadieron 150 μL de solución de lisis III (acetato de sodio 3M) incubando 10 minutos en hielo. Enseguida se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff de 2 mL, se añadieron 450 μL de isopropanol, se mezcló e incubó a –20°C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500

μL de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 μL de TE IX.

Con el ADN obtenido se realizó la caracterización de las clonas con enzimas de restricción y su patrón de corte fue analizado en geles de agarosa.

2.3.1.1.6 Linearización del vector pBS-Cre con enzimas de restricción.

La construcción obtenida se linearizó con la enzima de restricción *Apa*I. Para ello se utilizaron 10 μg del vector pBS-Cre conteniendo la secuencia codificante de la enzima Cre recombinasa y una unidad de enzima *Apa*I por cada μg de ADN plasmídico. Las condiciones de reacción y tiempos de incubación son los mismos que anteriormente se mencionaron.

2.3.1.1.7 Conversión de los extremos cohesivos en extremos romos.

La enzima *Apa*I produce extremos cohesivos, por lo que fue necesario convertirlos en extremos romos. Para ello se utilizaron 5 μg del plásmido pBS-Cre linearizado y 1 unidad del fragmento Klenow, 2.5 μL de dNTP's, 2 μL de Buffer de reacción 10X y agua en un volumen final de 20 μL. La reacción se llevó acabo a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción calentando a 75°C durante 10 minutos.

2.3.1.2 Amplificación y clonación de la región 5′ del gen Pitx3

2.3.1.2.1 Extracción de ADN genómico

Para la amplificación de la región 5′ del gen Pitx3 fue necesario obtener ADN genómico de la cepa de ratones 129Sv. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un fragmento de tejido, proveniente de la cola de los ratones 129Sv como se describe: la muestra de tejido se colocó en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se le agregaron 750 µl de buffer de lisis conteniendo proteinasa K a 200 ng/mL. Se incubó durante toda la noche a 55°C en baño maría. Al día siguiente se añadieron 350 µl de fenol y 350 µl de sevage y se agitó en vortex. Posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. en una microcentrífuga durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo eppendorf, se le adicionó 1/10 de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se agitó suavemente por inversión. El ADN flotante se recogió con una pipeta Pasteur previamente sellada y curveada de la punta. Se lavó dos veces con etanol al 70% frío, sumergiendo y sacando la pipeta con el ADN, se dejó secar el ADN a temperatura ambiente en la varilla, antes de resuspenderlo en TE 1X. El ADN genómico íntegro se almacenó a 4°C. La calidad de las preparaciones del ADN se determinó mediante la medición de la densidad óptica (O.D.) a 260 nm y 280 nm.

2.3.1.2.2 PCR

Para la amplificación de la región 5′ del gen Pitx3, se utilizó el ADN genómico previamente extraído. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 1. Amplificación de la región 5′ del gen Pitx3: condiciones de reacción.

Componentes del PCR	Concentración final
Buffer 10 X	IX
Mg(AcO)2 25 mM	1.5 mM
dNTPs 25mM	2.5 nM
Iniciador Pitf 5′ (GGCACTCCTGTGTCTAGCTGCC)	4 ng/μL
Iniciador Pitr 3′(CAGCCCTCACAAGTGCGAACAC)	4 ng/μL
ADN polimerasa rTth	0.05 U/μL
ADN 1 μg/μL	10 ng/μL
H_2O mQ estéril	8.5 μL

Tabla2. Programa utilizado en la amplificación de la región 5′ del gen Pitx3.

El programa de amplificación que se utilizó, consiste en los siguientes pasos:	
1. Desnaturalización previa	80°C por 5 minutos (Hot start)
2. Desnaturalización inicial	92°C por 2 minutos
3. 35 ciclos:	
Desnaturalización	92°C por 30 segundos
Alineamiento	60°C por 30 segundos
Elongación	68°C por 4 minutos
4. Extensión prolongada	72°C por 10 minutos

Los productos de PCR obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1.0%.

2.3.1.2.3 Clonación de la región 5′ del gen Pitx3.

El producto de PCR previamente obtenido se clonó en el vector pBS-Cre en el sitio *Apa*I. Para ello se utilizaron 50 ng de ADN del vector linearizado y 150 ng del producto de PCR amplificado, 1 unidad de la enzima ADN ligasa y 3 μL de Buffer de ligación 5X en un volumen total de 15 μL. La ligación se incubó a 15°C durante toda la noche. Posteriormente la ligación fue transformada en la cepa de bacterias DH5α, se purificó el ADN plasmídico y se caracterizaron las clonas recombinantes de la forma anteriormente descrita.

2.3.1.2.4 Extracción de ADN plasmídico a gran escala (Maxi-preparación)

La clona recombinante obtenida fue procesada para la obtención de ADN plasmídico a gran escala utilizando el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols. Se inoculó una colonia bacteriana en 5 ml de caldo de cultivo LB con 5 μL de ampicilina (400 μg), se incubó a 37°C y a 150 rpm durante toda la noche. El cultivo se inoculó en 25 ml de caldo LB con 25 μL de ampicilina y se incubó a 150 rpm y a 37°C durante toda la noche. Posteriormente los 30 mL de cultivo se inocularon en 500 mL de caldo LB con 500 μL de ampicilina (50μg/mL) en las condiciones ya descritas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón de bacterias se resuspendió en 10 mL de solución de lisis I.

Posteriormente se añadieron 10 mL de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10M, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8. mL de agua), se mezcló por inversión y se incubó a TA durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 10 mL de solución de lisis III (acetato de Sodio 3M) y se incubó en hielo por 20 minutos. Nuevamente se centrifugó a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Al mismo tiempo, se equilibró una columna de intercambió iónico con 10 mL de buffer QBT. Enseguida se filtró el sobrenadante y se lavó dos veces la columna con 30 mL de buffer QC. El ADN se extrajo de la columna con 15 mL de buffer de elusión QF. El ADN en suspensión se precipitó con 10.5 mL de Isopropanol y centrifugación a 13,000 rpm a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante se