



Universidad
Zaragoza



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Caracterización fenotípica de la sobreexpresión *Pcyox1* en ratón

Phenotypic characterization of *Pcyox1* overexpression in mouse

Autor:

Elena Gimeno Blasco

Director/es:

Jesús De La Osada García
Luis Vicente Herrera Marcos

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grupo Dieta Mediterránea y potencial nutracéutico

Curso 2017-2018 - Grado en Biotecnología

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Gen y proteína <i>Pcyox1</i>	2
2.2. pLIVEIRESluc.....	3
3. OBJETIVOS	3
4. MATERIALES y MÉTODOS	4
4.1. Diseño del plásmido y clonaje de <i>Pcyox1</i>	4
4.1.1. Obtención de la secuencia codificante de <i>Pcyox1</i> mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa.....	4
4.1.1.1. Extracción de RNA.....	4
4.1.1.2. Retrotranscripción.....	5
4.1.1.3. Diseño de los cebadores.....	5
4.1.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	6
4.1.1.5. Verificación, purificación y extracción del gel del producto de PCR.....	7
4.1.2. Linearización del plásmido pLIVEIRESluc.....	7
4.1.2.1. Digestión con <i>Bam</i> HI.....	7
4.1.2.2. Purificación en gel de agarosa y extracción del plásmido del gel.....	7
4. 1.3. Cuantificación de inserto + plásmido.....	8
4. 1.4. Precipitación con etanol	8
4. 1.5. Recombinación	9
4.2. Transformación de las bacterias.....	9
4. 3. Análisis de las colonias.....	9
4.3.1. Extracción cloroformo – fenol.....	9
4.3.2. Análisis mediante enzimas de restricción.....	10
4.3.3. Secuenciación Sanger.....	10
4.3.3.1. Extracción del plásmido por Miniprep.....	10
4.4. Valoración funcional del plásmido en cultivo celular HepG2.....	11
4. 4.1. Obtención del plásmido a gran escala mediante Maxiprep.....	11
4. 4.2. Transfección del plásmido.....	12
4. 4.3. Estudio actividad luciferasa.....	12
4. 4.4. Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR.....	12

4.5. Sobreexpresión de <i>Pcyox1</i> en el ratón.....	13
4.5.1. Inyección hidrodinámica del plásmido con <i>Pcyox1</i>	14
4.5.2. Medida actividad luciferasa.....	14
4.5.3. Toma de muestras.....	14
4.5.4. Estudio expresión hepática de <i>Pcyox1</i>	15
4.5.4.1. Extracción de ARN.....	15
4.5.4.2. Purificación del ARN.....	15
4.5.4.3. Retrotranscripción	15
4.5.4.4. qPCR.....	15
4.5.5. Caracterización proteica de PCYOX1 por Western Blotting.....	15
4.5.5.1. Extracción proteica.....	16
4.5.5.2. Determinación de la concentración proteica por el método de Bradford.....	16
4.5.5.3. Inmunodetección de PCYOX1.....	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1. Diseño del plásmido y clonaje de <i>Pcyox1</i>	18
5.1.1. Obtención de la secuencia codificante de <i>Pcyox1</i> mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa.....	18
5. 1.2. Linearización del plásmido pLIVEIRESluc.....	19
5.1.3. Cuantificación de inserto + plásmido.....	19
5.2. Análisis de las colonias mediante enzimas de restricción.....	19
5.3. Secuenciación Sanger.....	20
5.4. Valoración funcional del plásmido en cultivo celular HepG2	20
5.4.1. Estudio actividad luciferasa.....	20
5.4.2. Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR.....	21
5.5. Sobreexpresión <i>Pcyox1</i> en ratón.....	21
5.5.1. Medida actividad luciferasa.....	21
5. 5.2. Extracción y purificación del ARN.....	21
5.5.3. Retrotranscripción y qPCR.....	22
5.5.4. Western Blot.....	22
6. CONCLUSIONES.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24
8. ANEXO.....	27

ABREVIATURAS

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: nucleasa que cataliza la hidrólisis de ADN

ADNc: ADN complementario

APS: Persulfato amónico

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa que cataliza la hidrólisis de ARN.

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ATP: trifosfato de adenosina, del inglés *adenosine triphosphate*

BSA: albúmina bovina

C: citosina

CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón

ddH₂O: agua ultrapura estéril

DMEM: medio esencial Eagle modificado por Dulbecco

dNTPS: desoxirribonucleótidos trifosfato de adenina, timina, guanina y citosina

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: etanol

FAD: Flavin adenin dinucleótido

G: guanina

Guías MIQE: Información mínima para la publicación de experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real, del inglés *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

HepG2: línea celular que deriva de tejido hepático de un varón Caucásico Americano de 15 años diagnosticado con carcinoma hepaticocelular.

Kb: kilobase

LB: medio Luria-Bertani

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MPM: Marcador de Peso Molecular

NaCl: Cloruro de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nt: nucleótido

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*

Pcl1: prenilcisteína liasa 1

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Pcyox1: prenilcisteína oxidasa 1

PrD: primer directo

PrR: primer reverso

PVDF: polifluoruro de vinilideno

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RNAseq: secuenciación completa del transcriptoma, de inglés *RNA sequencing*

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a retrotranscripción

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SOC: medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa).

STE: *Sodium cloruro-Tris-EDTA*

T: timina

Taq ADN polimerasa: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

TBE: Tris, Borato y EDTA

TEMED: N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamina

Tm: temperatura de fusión del ADN

UA: Unidades Arbitrarias

URL: Unidades Relativas de Luminiscencia

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

1. RESUMEN

El gen *Pcyox1* o prenilcistein oxidasa 1 codifica una enzima implicada en la degradación de proteínas preniladas liberando peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno. Se expresa de manera ubicua en todos los tejidos, y su expresión hepática es la responsable de su presencia en las lipoproteínas VLDL y LDL del plasma. También se encuentra en los lisosomas. Se ha propuesto su actividad como fuente de estrés oxidativo en la aterosclerosis y factores de la dieta y hormonas son muy importantes en su regulación. Está implicada en diversos procesos celulares como la modulación de la cadena respiratoria, la muerte celular o el metabolismo y degradación de proteínas. Además, la posible asociación a enfermedades de sus variantes genéticas o su relación con el cáncer, obesidad o enfermedad cardiovascular todavía se desconoce.

Dado que el hígado es la fuente principal de la presencia plasmática de esta enzima, este estudio pretende la sobreexpresión hepática de *Pcyox1* en ratones normales de la estirpe C57BL/6J. Para ello, se clonó el gen hepático murino *Pcyox1* en un plásmido (pLIVEIRESluc) con promotor específico de hepatocito, un gen reportero de luciferasa y un gen de resistencia a kanamicina para la selección bacteriana utilizando el In-Fussion® HD Cloning kit de Takara Bio USA. Posteriormente, se valoró la funcionalidad del plásmido en el modelo celular HepG2, previo a la inyección hidrodinámica de los modelos animales para verificar su sobreexpresión mediante luminiscencia y expresión de ARNm.

En los resultados se comprobó la sobreexpresión hepática de *Pcyox1* en los animales tratados.

ABSTRACT

Pcyox1 or prenilcistein oxidase 1 gene codifies for an enzyme involved in the degradation of prenylated proteins releasing hydrogen peroxide, a reactive oxygen species. It is expressed ubiquitously in all tissues, and its hepatic expression is responsible for its presence in plasma lipoproteins VLDL and LDL. It is also found in lysosomes. Its activity has been proposed as a source of oxidative stress in atherosclerosis and diet factors and hormones are very important in its regulation. It is involved in various cellular processes such as modulation of the respiratory chain, cell death or metabolism and protein degradation. In addition, the possible association with diseases of its genetic variants or its connection with cancer, obesity or cardiovascular disease is still unknown.

Since the liver is the main source of the serum presence of this enzyme, this study aims to achieve hepatic overexpression of *Pcyox1* in wild-type C57BL/6J mice. For that, murine hepatic *Pcyox1* gene was cloned in a plasmid (pLIVEIRESluc) containing a hepatic specific promoter, a luciferase gene reporter and a kanamycin resistance gene for bacterial selection by using the Takara Bio USA In-Fussion® HD Cloning kit. Subsequently, the functionality of the plasmid was evaluated in the HepG2 cellular model, prior to the hydrodynamic injection of the animal models to verify its overexpression using luminescence and mRNA levels.

Results confirmed the hepatic overexpression of *Pcyox1* in the treated animals.

2. ANTECEDENTES

2.1. Gen *Pcyox1*

Pcyox1 o prenilcisteína oxidasa 1, anteriormente conocido como *Pcl1* o prenilcisteína liasa 1, codifica una tioeter monooxigenasa dependiente de FAD que cataliza la S-oxidación de los tioéteres de prenilcisteínas en el paso final de la degradación de proteínas preniladas, liberando peróxido de hidrógeno, cisteína y el aldeído isoprenoide (1, 2, 3).

El gen murino *Pcyox1* se localiza en el cromosoma 6 y se han identificado 6 exones y 5 intrones (4, 5), aunque recientemente tecnologías de RNAseq de alta resolución han identificado 3 exones adicionales (6).

Se han encontrado 387 polimorfismos en la secuencia del ADN codificante (4) pero no hay evidencias experimentales que asocien estas variaciones a enfermedad alguna. Solo se han encontrado 4 copias de variaciones asociadas con anomalías citogenéticas y no se han llevado a cabo más experimentos para evaluar su contribución patológica (1).

A pesar de que el gen *Pcyox1* se expresa de manera ubicua en casi todos los tejidos, – los niveles del ARNm son altos en el músculo, el tracto gastrointestinal, el riñón y el tejido reproductor femenino (6, 7) - la expresión hepática de *Pcyox1* es la responsable de su presencia en las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) del plasma. En estas lipoproteínas, la liberación de peróxido de hidrógeno resultado de su actividad catalítica es una fuente de estrés oxidativo que puede aumentar el daño en situaciones de gran actividad, pudiendo agravar la aterosclerosis de las LDL (1).

Además de poderse exportar a las lipoproteínas del plasma, PCYOX1 se encuentra principalmente en los lisosomas (8, 9). En el hígado, el gen *Pcyox1* codifica 8 transcritos (6) generados por la combinación de 5 puntos diferentes de inicio de la transcripción y por *splicing* alternativo (1). La expresión hepática de PCYOX1 es muy compleja en términos de regulación, y factores como la dieta y hormonas son elementos importantes (10).

Basado en su secuencia de amino ácidos, su peso molecular sería 56 kDa, no obstante en cerebro se ha observado que posee 63 kDa. Este hecho se debe a una modificación postranscripcional mediante la cual PCYOX1 estaría glicosilada en el cerebro (11). Análisis computacionales posteriores revelaron la existencia de motivos adicionales susceptibles de ser acetilados, fosforilados, ubiquitinados, sumoilados o succinilados. Esto podría justificar porqué su tamaño en hígado es de unos 70 kDa (1). Además, la proteína contiene un péptido señal, el cual se escinde durante el procesamiento post-traducciona (8).

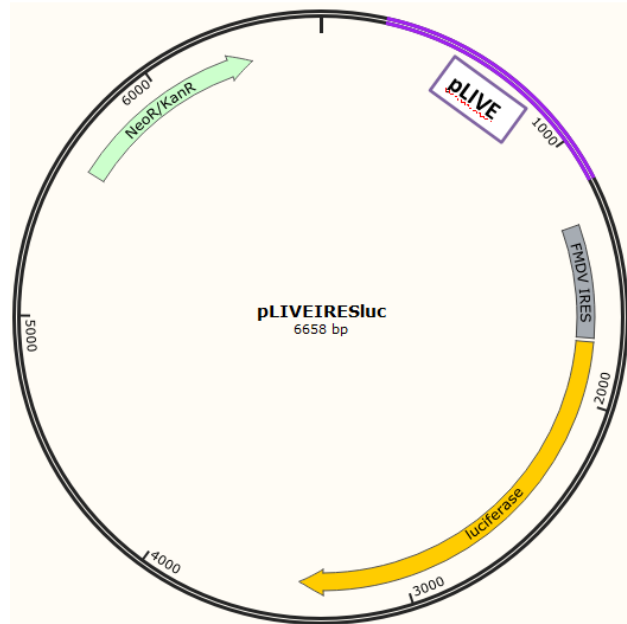
La interacción de PCYOX1 con un gran número de proteínas diferentes determina su papel en diversos procesos celulares como la modulación de la cadena respiratoria, la muerte celular o el metabolismo y degradación de proteínas (5, 12).

Dado que el hígado es la fuente principal de esta enzima, debería caracterizarse la regulación hepática de la misma y su traducción a los cambios de LDL. Además, muchas de las variantes genéticas y su posible asociación a enfermedades o su relación con el cáncer, obesidad o enfermedad cardiovascular, están todavía por conocer.

2.2. pLIVEIRESluc

El vector de expresión utilizado para realizar el clonaje de *Pcyox1* y posteriormente lograr la sobreexpresión hepática en ratones normales de la estirpe C57BL/6J consta de 6658 pares de bases (pb) en total y tiene los siguientes elementos característicos:

1. Luciferasa, en amarillo. Actúa como gen reportero para evaluar si el cultivo celular y los animales expresan o no el plásmido. Su actividad se basa en la oxidación de la luciferina por parte de la luciferasa con gasto de ATP (procedente de la transformación del pirofosfato por la enzima sulfurilasa), liberando luz que puede detectarse por luminiscencia.
2. Resistencia a kanamicina y neomicina (NeoR/KanR), en verde.
3. Promotor específico del tejido hepático (pLIVE), en morado. Fusión de las regiones de los genes de albúmina y α -fetoproteína.
4. Sitio interno de entrada al ribosoma del virus de la fiebre aftosa (FMDV IRES), en gris. Se encuentra en el extremo 5' UTR y permite el inicio de la traducción del ARNm, encargándose de la expresión bajo el mismo promotor (pLIVE) del gen de la luciferasa y el inserto (*Pcyox1*) que se clone delante.



→ **Figura 1:** plásmido pLIVEIRESluc utilizado para valorar la expresión de *Pcyox1* en cultivo celular y modelo animal

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es lograr la sobreexpresión hepática de *Pcyox1* en ratones normales de la estirpe C57BL/6J. Para ello, se deben alcanzar los siguientes objetivos:

- Obtención del ADNc: extracción de ARN de tejido hepático y retrotranscripción.
- Clonaje en un vector de expresión y comprobación de su funcionalidad en una línea celular.
- Sobreexpresión del gen en hígado de ratón: inyección hidrodinámica y verificación:
 1. Análisis luminométrico
 2. Análisis del ARNm: mediante RT-PCR
 3. Análisis de expresión proteica: mediante Western Blot

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño del plásmido y clonaje de *Pcyox1*

Dada la necesidad de investigar el papel de PCYOX1 en el metabolismo hepático y su regulación, así como su implicación en el aumento de la aterogenicidad de las LDL, se llevó a cabo el clonaje de la secuencia de *Pcyox1* en el plásmido pLIVEIRESLuc para llevarlo a estudio en cultivo celular de la línea HepG2 y, posteriormente, en modelo animal experimental de ratón normal de la estirpe C57BL/6J (objeto de este Trabajo Fin de Grado).

4.1.1. **Obtención de la secuencia codificante de *Pcyox1* mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa**

4.1.1.1. Extracción de ARN

Para la obtención de la secuencia codificante del inserto *Pcyox1*, se parte de tejido hepático que en primer lugar hay que lisar. Para ello, se selecciona una muestra de entre 10 y 20 mg y para minimizar su degradación se trabaja en hielo seco y el material de trabajo se esteriliza previamente con calor seco a 120 °C durante 24 horas. A partir de la muestra hepática se siguió el protocolo establecido por el kit de Quick-RNA *MiniPrep Plus* de Zymo Research™:

- El fragmento hepático se homogeneizó mecánicamente con 400 µl de RNA *Lysis Buffer* y se centrifugó a 13500 g durante 30 segundos. Se transfirió el sobrenadante a la columna Spin-Away™ Filter y se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto para eliminar el ADN genómico.
- La columna en la que habrá quedado el ADN genómico se desechó y en el tubo colector donde estará el ARN se añadió un volumen de etanol 1:1. Se mezcló bien y se transfirió a la columna Zymo-Spin™ III CG. Se centrifugó durante 1 minuto a 13500 g y se descartó el sobrenadante ya que el ARN habrá quedado en la columna.
- Se añadieron 400 µl de RNA *Wash Buffer* y se centrifugó 1 minuto a 13500 g. A continuación, se preparó un mix con 5 µl de ADNasa I y 75 µl de DNA *Digestion Buffer* para eliminar los restos de ADN y se añadió sobre la matriz de la columna. Se incubó a temperatura ambiente y centrifugó, descartando el líquido filtrado.
- Se añadieron 400 µl de RNA *Prep Buffer*, se centrifugó 1 minuto a 13500 g y se desechó el líquido filtrado. A continuación se añadieron 700 µl de RNA *Wash Buffer*, se volvió a centrifugar 1 minuto a 13500 g y se volvió a descartar el filtrado. Después, se añadieron 400 µl de RNA *Wash Buffer* y, en este caso, se centrifugó durante 2 minutos para eliminar completamente el tampón de lavado.
- La columna se transfirió a un tubo libre de ARNasa y se añadieron 50 µl de agua libre de ARNasa/ADNasa sobre la matriz. Se dejó depositar y se centrifugó 30 segundos a 13500 g. Este paso se repitió dos veces.

Una vez extraído el ARN, se procedió a comprobar su calidad.

Por una parte, se midió la concentración de ARN y su pureza en el equipo SPECTROstar NANO (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. El máximo de absorbancia del ARN es de 260 nm, medida con la que se pudo calcular la concentración en ng/μl. Para determinar la pureza, se calcula el ratio $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, que para ARN debe ser alrededor de 2 (si fuera < 1.8 indicaría posible contaminación por proteínas).

La absorbancia a 260 nm y la relación $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ sólo da una indicación de la cantidad de ARN y de su pureza, pero no dice nada sobre el nivel de degradación de ARN. Así, por otra parte, la integridad del ARN se comprueba en un gel de agarosa al 1% (45 ml de buffer 1x TBE y 0,45 g de agarosa) que se dejó correr durante 20 minutos a 90 V.

Transcurrido el tiempo de electroforesis, el gel se visualizó en el transiluminador Gel Doc™ XR (BioRad) esperando ver las dos bandas correspondientes al ARNr 28 S y 18 S. Una tercera banda correspondiente al ARNr 5 S puede verse más clara y abajo del todo.

4.1.1.2. Retrotranscripción

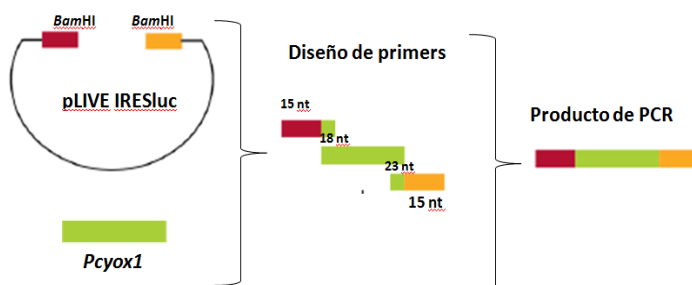
Una vez comprobada la calidad e integridad del ARN, se retrotranscribió a ADNc utilizando el kit Prime Script™ Reagent (Perfect Real Time). Se retrotranscribieron 500 ng y se completó hasta 6,5 μl con agua. Por otro lado, se preparó un mix de 3,5 μl:

- Oligo-dT..... 0,5 μl
- Random hexamer primers ... 0,5 μl
- Retrotranscriptasa 0,5 μl
- Buffer 5x 2 μl

Este mix se mezcló con los 6,5 μl de muestra (más agua), se llevó al termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad y se utilizó la siguiente secuencia: 15 minutos a 37 °C (tiempo para la transcripción inversa), 5 segundos a 85 °C (inactivación de la transcriptasa reversa por tratamiento con calor) y mantenimiento a 4 °C hasta recoger los productos PCR.

4.1.1.3. Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores es muy importante para que la reacción sea específica. A partir de las secuencias conocidas del plásmido pLIVEIRESLuc y del gen *Pcyox1* y teniendo en cuenta que se quiere amplificar *Pcyox1*, los oligos se diseñan en base a las reglas de contenido en G + C entre el 40 y el 60%, evitando Tm muy diferentes y con una longitud de entre 18 y 25 nucleótidos (nt) con G o C en 3'. Además, deberán tener una cola de 15 nt homólogas al punto de corte concreto de *BamHI* del plásmido pLIVEIRESLuc para permitir la recombinación.



→ **Figura 2:** Diseño de *primers* para la recombinación mediante el protocolo *In Fusion* en base a la secuencia del inserto de interés *Pcyox1* y las secuencias conocidas del plásmido pLIVEIRESLuc

De esta manera, el cebador directo (PrD) presenta 15 nt en común con el plásmido pLIVEIRESluc anteriores a la zona de corte de *BamHI* en su zona 5', más 18 nt específicos del gen de estudio en su extremo 5'. Por otro lado, el cebador reverso (PrR) presenta 15 nt comunes al plásmido pLIVEIRESluc posteriores a la zona de corte de *BamHI* en su zona 5', más 23 nt específicos a *Pcyox1* en su extremo 3' (Figura 2). Estos oligos se encargaron a la casa ThermoFisher™ Scientific (secuencias en la sección Anexo).

4.1.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez diseñados los primers, con el objetivo de obtener la secuencia codificante de *Pcyox1* y amplificarla, se procedió a hacer una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el Clone AmpHiFi PCR premix del *In-Fusion® HD Cloning Kit* de Takara Bio USA.

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa se basa en la capacidad de la ADN polimerasa para sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde. Debido a que la ADN polimerasa solo puede añadir nucleótidos a un grupo 3'-OH preexistente, necesita un cebador al que pueda agregar el primer nucleótido. Al final de la reacción de PCR, la secuencia específica se acumulará en miles de millones de copias (amplicones) (13). La mezcla de reacción preparada contenía los siguientes componentes:

- ADNc molde que contiene la secuencia diana (en este caso *Pcyox1*), obtenido a partir de la retrotranscripción del ARNm hepático de ratones normales C57BL/6J.
- *Clone AmpHiFi PCR Premix 2X* proporcionado por el kit que contiene los componentes necesarios para la PCR: la *Taq* ADN polimerasa; los dNTPs para la síntesis de las nuevas hebras de ADN; MgCl₂ que estabiliza la doble hélice y es cofactor esencial para la reacción; y, por último, el tampón que aporta el pH y la fuerza iónica óptimos.
- PrD y PrR. La concentración final que recomienda el protocolo es 300 nM. Se partió de una concentración de ambos de 5 µM, se añadieron 1,2 µl de cada uno a la mezcla.
- Agua: para completar los 20 µl de reacción y disolvente del resto de componentes.

La mezcla de reacción se llevó al termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad en el que se siguió el siguiente programa:

REACCIÓN PCR		PROGRAMA TERMOCICLADOR	
ADNc (10 ng/µl)	1 µl	Iniciación	95 °C - 5 minutos
PrD 5 µM	1,2 µl	1. Desnaturalización	98 °C – 10 segundos
PrR 5 µM	1,2 µl	2. Alineación	60 °C – 10 segundos
Clone AmpHiFi PCR Premix 2X	10 µl	3. Extensión	72 °C – 10 segundos
Agua	6,6 µl	Terminar polimerización	72 °C – 30 segundos

→ **Tabla 1:** Mezcla de reacción para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y programa del termociclador que se siguió con las diferentes fases llevadas a cabo.

Hay una primera fase de inicio a 95 °C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización de las hebras de ADN a la que le siguen 35 ciclos de 3 fases cada ciclo: una primera de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, una segunda fase de alineación o

hibridación a 60 °C durante 10 segundos y una tercera fase de extensión a 72 °C durante 10 segundos. Una vez completados los 35 ciclos, hay una última fase a 72 °C durante 30 segundos para que la ADN polimerasa termine de polimerizar las nuevas cadenas de ADN.

4.1.1.3. Verificación, purificación y extracción del gel del producto de PCR.

Para verificar la amplificación del inserto *Pcyox1* se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cargaron 250 ng (50 ng/μl) de marcador de pesos moleculares de 1 kb *DNA Ladder* de ThermoFisher™ y para la muestra a evaluar se procedió de la siguiente manera: sobre un celo se depositó 1 μl de *Loading buffer X6*, 2 μl de TE y 2 μl de producto de PCR.

Se cerró la cubeta y se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se programó a 90 V durante 20 minutos. Una vez pasado el tiempo, se paró la corriente y se valoró en el Gel DocXs haciendo una fotografía.

Cuando se comprobó la presencia del inserto, se purificó la PCR resultante para eliminar lo indeseado como pueden ser fragmentos incompletos de ADN. Para ello, se separó en el gel de agarosa al 1% el resto de producto de PCR (18 μl) y se siguieron los mismos pasos descritos anteriormente a diferencia del tiempo de electroforesis que fue de 120 minutos (90 V), ya que en este caso interesa purificar el ADN y separarse bien a lo largo del gel mientras que en el caso anterior con visualizar que aparecía la banda del inserto de interés era suficiente. Una vez transcurrido el tiempo, se localizó el fragmento deseado en un transiluminador y con la ayuda de un bisturí se cortó el producto de PCR para su recuperación del gel de agarosa.

La extracción del producto de PCR del gel de agarosa se llevó a cabo siguiendo el protocolo de *GenJet Gel extraction kit* de ThermoFisher.

4. 1. 2. Linearización del plásmido

4.1.2.1. Digestión con *Bam*HI

Se linearizó el vector plasmídico con la enzima de restricción *Bam*HI para insertar después por recombinación el inserto *Pcyox1*. Se llevó a cabo la digestión de 2 μg (500 ng/μl) de pLIVEIRESLuc durante 1 h a 37 °C con 5 UI (5 UI/μl) de *Bam*HI:

LINEARIZACIÓN pLIVELuc	
Tampón de <i>Bam</i> HI 10x	2 μl
<i>Bam</i> HI	1 μl
pLIVEIRESLuc	4 μl
H ₂ O	13 μl

4.1.2.2. Purificación en gel de agarosa y extracción del plásmido del gel

Para purificar el plásmido, una vez linearizado, se preparó un gel de agarosa al 0,8% (igual que se ha explicado anteriormente se pesan 0,4 g de agarosa y se disuelven en 45 ml de tampón TBE 1X) para realizar una electroforesis durante 24 h a 25 V. Se añadieron 20 μl del

producto de digestión + 4 µl de tampón de carga. La electroforesis se dejó 24 h para conseguir una buena separación del plásmido digerido (lineal), que avanzará más en el gel, del no digerido (circular), que quedará más arriba, ya que la enzima puede dejar parte de plásmido sin digerir, el cual entra mucho más fácil en las bacterias.

Cuando la muestra era lo suficientemente nítida y el peso molecular era el esperado para el plásmido lineal, se procedió a recortarlo con bisturí y extraerlo del gel de agarosa mediante el protocolo *GenJet Gel extraction* kit de ThermoFisher. Una vez linearizado, extraído y eluido, el plásmido se almacenó a -20 °C.

4.1.3. Cuantificación de inserto + plásmido

Para valorar la concentración de inserto y plásmido en una relación proporcional y saber la cantidad de cada uno a poner en la reacción de recombinación, la cuantificación se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de una décima parte del plásmido y del inserto. El umbral de detección es de 1 ng. Se cargan 10 µl de marcador de peso molecular Lambda DNA/*HindIII* de ThermoFisher™ que van a corresponder a 500 ng y así poder cuantificar las bandas de inserto y plásmido.

Se conectan los electrodos a la fuente de alimentación y se deja correr a 90 V. Para la cuantificación se toman 2 fotografías del gel debido a la diferencia de tamaños entre el plásmido (6,6 kb) y el inserto (1,3 kb). Una primera a unos 20 minutos que será la óptima para el inserto ya que avanza más rápido al ser de menor tamaño y una segunda un tiempo más tarde para el plásmido que avanzará más lento.

De esta manera, en función de las intensidades de las bandas podemos hacer una recta de calibrado con los el MPM porque sabemos cuánto hemos cargado y cuantos pb corresponde cada banda y en esa recta interpolar el resultado del inserto y el plásmido

4. 1. 4. Precipitación por EtOH de inserto y plásmido

Una vez conocida la concentración de inserto y plásmido, se llevó a cabo su precipitación conjunta por EtOH para controlar mejor los volúmenes de reacción y que la pérdida de muestra fuera igual para ambos. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

Se añadió 1/10 del volumen de NaCl 5 M al volumen de inserto más plásmido para aumentar la salinidad. A continuación se añadió un volumen igual de isopropanol para que quedara al 50% y se incubó durante 15 minutos a -80 °C. El isopropanol va a atrapar agua disminuyendo la solubilidad del ADN y favoreciendo la precipitación. Tras la incubación, se centrifugó 15 minutos a 15000 g a 4 °C. El sobrenadante se retiró y el pellet se lavó con etanol al 70% tres veces para eliminar el isopropanol, inhibidor de enzimas. Al final, se eliminó todo el sobrenadante posible con la pipeta y finalmente se seca el pellet en el *speedvac*.

4. 1. 5. Recombinación

El pellet obtenido mediante la precipitación por EtOH se resuspendió en 4 µl de ddH₂O con ayuda de calor y se procedió a recombinar el inserto *Pcyox1* y el plásmido añadiendo 1 µl de *In-Fusion Enzyme Premix 5X* de Takara y se dejó incubar 30 minutos a 50 °C en el termociclador S1000™ ThermalCycler de BioRad.

4.2. Transformación de las bacterias

Tras la recombinación, el siguiente paso es la transformación de las bacterias competentes, capaces de captar ADN desnudo del medio externo. Se siguió el protocolo de *Stellar™ Competent Cells PT5055-2* de Clontech:

- Primero se descongeló la alícuota comercial y se tomaron 50 µl de células a los que se añadieron 2 µl del producto de reacción *In-fusion*. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo para que el ADN plasmídico entrara al interior de las bacterias competentes.
- Pasado el tiempo de incubación, las bacterias se sometieron a un shock térmico de 1 minuto a 42 °C en baño termostaticado. A continuación, se volvieron a incubar 1–2 minutos en hielo y se añadieron 300 µl de medio SOC para una eficacia de transformación máxima. Se incubó 15 minutos en agitación a 37 °C.
- Por último, se sembraron dos placas de LB agar kanamicina (50 µg/ml), previamente preparadas, a dos concentraciones logarítmicas distintas con el asa de *Driglasky* y se incubaron durante toda la noche en estufa a 37 °C.

Al día siguiente se seleccionaron las colonias objeto de estudio y se les hizo un duplicado de seguridad a otra placa con kanamicina y se dejaron incubar a 37 °C durante toda la noche.

4. 3. Análisis de las colonias

4.3.1. Extracción cloroformo - fenol

Una vez seleccionadas las colonias a estudiar se llevó a cabo la extracción del ADN de las bacterias mediante una bifase cloroformo-fenol que contenía las siguientes proporciones: 24 volúmenes de cloroformo, 1 volumen de alcohol isoamílico y 25 volúmenes de fenol. El protocolo que se siguió para la extracción fue el siguiente:

- Se resuspendió la colonia a estudiar en 45 µl de medio STE y se le añadieron 30 µl de la mezcla cloroformo – fenol descrita. Se vorteoó para lisar las bacterias y extraer los ácidos nucleicos. A continuación se centrifugó 10 minutos a 12000 g. Tras la centrifugación se observaron dos fases y una interfase: los ácidos nucleicos con el ADN plasmídico quedaron en la fase superior, en la interfase las proteínas y en la fase inferior los lípidos y restos celulares y el fenol.

- Se tomaron 25 μl de la fase superior sobre los que se añadió 1 μl de ARNasa libre de ADNasa a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se incubó 30 minutos a 55 $^{\circ}\text{C}$.

De esta manera, se obtuvo el ADN plasmídico susceptible de estudio mediante análisis de restricción.

4.3.2. Análisis mediante enzimas de restricción

Para el análisis de restricción se eligió a la enzima *EcoRI*, la cual da un patrón de digestión de tres fragmentos en el plásmido deseado de 539, 1513 y 5934 pb.

Se preparó la enzima con su respectivo tampón compatible y se añadió el volumen correspondiente del ADN plasmídico para poder visualizarlo en el gel de electroforesis completando con agua de PCR hasta 20 μl . La mezcla se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora.

Una vez pasado el tiempo de digestión, se evaluaron las muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90 V durante 1 hora cargando 7 μl de la muestra de digestión junto a 2 μl de *Loading buffer*. En otra calle se cargaron 5 μl de MPM GeneRuler 1kb DNA Ladder.

4.3.3. Secuenciación Sanger

4.3.3.1. Extracción del plásmido por Miniprep

Para proceder a secuenciar la muestra a secuenciar, en primer lugar hay que realizar una Miniprep o extracción del ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano. Se utilizó el kit comercial de *ZymoPURE™ Plasmid Miniprep* y a partir de la colonia positiva se preparó una suspensión bacteriana de 10 ml en LB con kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

De los 10 ml de cultivo bacteriano en LB se guardó una alícuota de 850 μl a la que se añadieron 150 μl de glicerol puro. Se mezcló en un criotubo y se guardó a -80 $^{\circ}\text{C}$. El resto del cultivo (9,2 ml) se sometió a la Miniprep siguiendo el siguiente protocolo:

- Se centrifugó 7 minutos a 6000 g para obtener un pellet de bacterias con el que trabajar. Después se añadieron 250 μl de *ZymoPURE™ P1* sobre el pellet y se resuspendió. Se añadieron 250 μl de *ZymoPURE™ P2* y se mezclaron con el P1. Se dejó reposar a temperatura ambiente. Las células se habrán lisado completamente cuando la solución aparezca morada, homogénea y viscosa. Después se añadieron 250 μl de *ZymoPure™ P3* y se mezcló hasta que la neutralización se completó y apareció un precipitado amarillo.
- El lisado neutralizado se incubó en hielo 5 minutos y después se centrifugó a 16000 g otros 5 minutos. De esta manera, se separaron las moléculas precipitadas del ADN plasmídico en solución. El sobrenadante se transfirió a un eppendorf® limpio y se añadieron 275 μl de *ZymoPure™ Binding Buffer* y se mezcló por inversión.
- A continuación se siguió el protocolo basado en centrifugaciones:

La mezcla con el *Binding Buffer* se pasó a la columna Zymo-Spin™ II-P y se incubó 2 minutos para después centrifugarse a 5000 g 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado y se hicieron una serie de lavados para eliminar los restos indeseados y para terminar, se transfirió la columna a un nuevo eppendorf® de 1,5 ml y se añadieron sobre la matriz 25 µl de *Elution Buffer*. Se dejó incubar 2 minutos y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto. Este paso se repitió una segunda vez y así se obtuvo un volumen final de 50 µl de ADN plasmídico.

A continuación se midió la concentración de ADN plasmídico extraído en el dispositivo NanoDrop ND – 1000 Spectrophotometer y a partir de ella, se prepararon 12 µl de ADN plasmídico a 100 ng/µl que se mandaron al servicio de secuenciación del CIBA junto a las secuencias de un PrD que hibridaba en el promotor pLIVE y un PrR que hibridaba en el inserto. Ambos primers a concentración 5 mM (secuencias en la sección Anexo).

4.4. Valoración funcional del plásmido en cultivo celular HepG2

Para poder valorar la funcionalidad del plásmido, nos valimos de la línea celular HepG2.

4. 4. 1. Obtención del plásmido a gran escala mediante Maxiprep.

Para obtener gran cantidad de pLIVEPcyox1IRESLuc se utilizó el kit para purificación de ADN *Endofree Plasmid Maxiprep* de QIAGEN®. El protocolo se describe a continuación:

- Se tomó 1 µl de bacterias congeladas y se inoculó en un tubo falcon con 5 ml de LB, se añadió kanamicina y se incubó a 37 °C durante 8 horas a 300 rpm. Después, se diluyó el cultivo en 250 ml de LB y se reintrodujo a incubar durante toda la noche.
- Se centrifugó a 6000 g durante 15 minutos a 4 °C para obtener el pellet de bacterias, el cual se resuspendió completamente en 10 ml de *Buffer P1*. Posteriormente, se añadieron 10 ml de *Buffer P2* y se mezcló por inversión del tubo y se dejó incubar a temperatura ambiente 5 minutos. La solución se volvió azulada.
- Se añadieron 10 ml de *Buffer P3* y se mezcló el contenido hasta que la solución se volvió incolora. La mezcla se introdujo en el cartucho QIA filter y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Pasado el tiempo, se quitó el tapón del cartucho y se introdujo un émbolo, se apretó y se extrajeron 25 ml a un tubo falcon de 50 ml.
- Se añadieron 2,5 ml de *Buffer ER* al falcon y se mezcló por inversión, luego se incubó en hielo 30 minutos. Mientras se incubaba se equilibró un QIAGEN-tip 500 con 10 ml de *Buffer QBT* dejando que pasase por gravedad. Se tomó el contenido del falcon y se introdujo en el QIAGEN-tip 500, se repitió hasta vaciar la totalidad del falcon.
- Se lavó el QIAGEN-tip 500 dos veces con 30 ml de *QC Buffer* cada vez y se descartó el líquido filtrado. Se eluyó el ADN con 15 ml de *QN Buffer* y se precipitó con 10,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 g 30 minutos a 4°C.
- Se lavó el pellet de ADN con 5 ml de etanol al 70% libre de toxinas a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 g 10 minutos. El sobrenadante se decantó, se dejó

desechar el pellet al aire durante 5-10 minutos y se resuspendió en tampón TE libre de endotoxinas. Se prepararon alícuotas en tubos Eppendorf® de 1,5 ml.

4.4.2. Transfección del plásmido

Para el experimento, las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos con 60 mm Ø, al 60% de confluencia en medio de crecimiento esencial *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) y suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina al 1%, estreptomycin al 1%, L-glutamina 4 mM y aminoácidos no esenciales al 1%.

Una vez alcanzada una confluencia del 80%, se retiró el medio de cultivo, se hizo lavado con PBS y se transfectó cada pocillo con 300 µl de la siguiente mezcla:

- 1) 5 µg de pLivePcyox1IRESLuc en 480 µl de medio DMEM (sería 3 µg en 300 µl)
- 2) 15 µl de *FuGENE® HD reagent* gota a gota (9 µl).
- 3) Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Se añadió la mezcla gota a gota con leve agitación.
- 5) Se completó el volumen a 2,5 ml/pocillo con medio de mantenimiento.

A las 48 horas de la transfección, se aspiró el medio de cultivo y las células HepG2 se recogieron con el reactivo *Tri-reagent* para estudiar la expresión de *Pcyox1*.

4.4.3. Estudio actividad luciferasa

Para valorar la funcionalidad del plásmido en las células transfectadas, se utilizó la luciferasa como marcador de expresión. Para ello se procedió de la siguiente manera:

Se añadió a cada pocillo tanta cantidad de *Dual-Glo® Reagent* como volumen de cultivo se pusiese colocándolo sobre 3 muestras y 3 blancos. La lisis celular ocurrió en 10 minutos. Por último, se valoró la luminiscencia siguiendo las instrucciones del protocolo en el espectrómetro SPECTROstar Omega de BMG LABTECH.

4.4.4. Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR

Para valorar la expresión de *Pcyox1* en las células HepG2 se siguieron los siguientes pasos:

1) En primer lugar, se extrajo el ARN de las células con el RNA *Lysis Buffer* y a continuación, se siguió el protocolo establecido por el kit de Quick-RNA *MiniPrep Plus* de ZymoResearch™ (página 4). Una vez extraído el ARN, se procedió a comprobar su calidad (concentración, pureza e integridad).

2) Posteriormente se retrotranscribió a ADNc, utilizando el kit Prime Script™ Reagent (Perfect Real Time), explicado en la página 5.

3) Tras obtener el ADNc, éste se utilizó como molde para realizar una qPCR. La Real-Time PCR (qPCR) mide en cada ciclo la cantidad de ADN que hay en las muestras y a medida que

avancen los ciclos, habrá más cantidad. En este trabajo, se usó el SYBR-Green como fluorocromo que se une inespecíficamente a la doble cadena de ADNc, emitiendo una cantidad de fluorescencia cuando la doble hebra del ADN se desnaturaliza por los ciclos de calentamiento. La fluorescencia, por tanto, será mayor cuantas más copias del fragmento haya en el medio de reacción (mayor expresión del gen).

Es una medida semicualitativa ya que se basa en valorar los animales control y tratamiento con referencias entre ambos grupos sin dar valores exactos. Para normalizar los datos, se comparan la expresión del gen de interés (*Pcyox1*) con la expresión de un *housekeeping* o gen constitutivo (su expresión no varía en las condiciones de estudio). En este caso, utilizamos la ciclofilina B (gen *PPIB*) como *housekeeping*.

Se cargan 10 ng de cada muestra de ADNc por duplicado y 1 µl de agua, también por duplicado, como control negativo en una placa de StepOne de 48 pocillos (Applied Biosystems). A continuación, se añade a cada pocillo 11,5 µl de mezcla de reacción que contiene:

	<i>Pcyox1</i>	<i>PPIB</i>
Cebador Directo	0,675 µl, 250 nM	0,25 µl, 100 nM
Cebador Reverso	0,75 µl, 300 nM	0,25 µl, 100 nM
Agua	3,825 µl	4,75 µl
SYBR-Green	6,25 µl	6,25 µl

→ **Tabla 2:** Mezcla de reacción para la qPCR llevada a cabo en cultivo celular HepG2.

Se utilizó el termociclador StepOne (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 20 segundos a 95 °C para activar los reactivos y desnaturalizar el ADNc; 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C. Las secuencias de los primers utilizados de acuerdo a las guías MIQE se encuentran en la sección *Anexo*.

El resultado de la qPCR nos ofrece también una curva de *melting* que indica si la PCR ha sido específica o no; es decir, si se ha obtenido uno o más productos de amplificación.

Además de la curva de *melting*, el sistema StepOne también proporcionó los datos correspondientes al C_T ("Thresholdpoint" o ciclo umbral) de cada pocillo de la placa. El C_T representa el ciclo en el cual la fluorescencia aumenta significativamente con respecto a la fluorescencia basal, punto en el que se considera que da comienzo la reacción de amplificación. Este valor es el que permitió determinar semicuantitativamente la expresión diferencial de cada gen.

4.5. Sobreexpresión *Pcyox1* en ratón

Después de haberse comprobado la sobreexpresión del plásmido en cultivo celular, el siguiente paso del estudio es comprobar su funcionamiento en el modelo animal del ratón.

El experimento se hizo en 20 ratones normales de la estirpe C57BL/6J siendo la mitad control sin transfección del plásmido y la otra mitad tratamiento con inyección del plásmido.

Durante la preparación previa y duración del experimento se mantuvieron en un hábitat con enriquecimiento ambiental así como alimento y agua *ad libitum* en el animalario del CIBA acorde a la legislación vigente sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013) siendo los procedimientos aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

A las 8 semanas de edad tuvo comienzo el experimento, el calendario seguido una vez comenzado fue el siguiente:

- 1) Día 0: Control pesos + Inicio *Western Diet* (20% grasas, 65% glúcidos, 15% proteínas).
24 días de dieta Western
- 2) Día 24: Inyección hidrodinámica (función de tamaño y peso de los ratones).
- 3) Día 26 (dos días después de la inyección hidrodinámica): Inyección luciferina para medición de luz y comprobar que ha habido transfección.
- 4) Día 27: Sacrificio y toma de muestras.

4. 5. 1. Inyección hidrodinámica del plásmido con *Pcyox1*

Con el objetivo de sobreexpresar *Pcyox1* en el hígado de manera específica, se utilizó la técnica de inyección hidrodinámica.

Para ello, en primer lugar hay que provocar vasodilatación en los animales mediante luz infrarroja para poder localizar y visualizar correctamente la vena caudal de la cola. Una vez que se ha producido la vasodilatación, se inyecta en la vena lateral de la cola de los animales tratamiento aproximadamente 2,5 ml del volumen preparado (15 µg de plásmido/ratón y el resto de suero fisiológico), ya que se necesita como mínimo 2 ml para provocar una hipervolemia y que el plásmido entre a los hepatocitos del ratón (14, 15). Gracias al promotor del plásmido, específico de hígado, y a que esta técnica tiene como principal diana el hígado, se consigue una expresión específica en tejido hepático.

4. 5. 2. Medida actividad luciferasa

A los 2 días de inyectar el plásmido en los ratones, se comprobó el funcionamiento del plásmido *in vivo* y la sobreexpresión de luciferasa mediante la medición de su actividad.

Este método consiste en inyectar 0,2 ml de luciferina a una concentración de 15 mg/ml en el peritoneo de los ratones, anestesiados con isofluorano. De esta manera, gracias a la actividad del gen reportero luciferasa colocado en el plásmido junto al gen de interés (*Pcyox1*), transcurridos 20 minutos se mide la luminiscencia mediante el IVISLumina.

4. 5. 3. Toma de muestras

Tras haber comprobado la sobreexpresión mediante el método de la luciferina, al día siguiente se procedió al sacrificio de los animales y toma de muestras.

En primer lugar, tras el sacrificio animal, se inmovilizó el animal en posición de decúbito supino y se abrió por la parte abdominal extrayendo el volumen total de sangre por aspiración desde el ventrículo izquierdo. Un volumen de aproximadamente 2 ml dependiendo del animal. Se recogieron muestras de suero y plasma (con EDTA como anticoagulante) y se centrifugaron 15 minutos a 3000 rpm para rescatarlos y almacenar diferentes alícuotas en -80 °C.

A continuación, se perfundió el animal con PBS frío para eliminar la sangre del hígado, que se extrajo en dos muestras: una parte se conservó en formaldehído para análisis histológico e inmunohistoquímico y el resto se almacenó a -80 °C hasta el momento de análisis.

4. 5. 4. Estudio expresión hepática de *Pcyox1*

Para comprobar si había habido expresión de *Pcyox1* en el tejido hepático de los ratones estudiados, se procedió de la siguiente manera:

4. 5.4.1. Extracción del ARN

Primero se seleccionó una alícuota de 10-20 mg de tejido hepático y a partir de ella se siguió el protocolo establecido por el kit de Quick-RNA *MiniPrep Plus* de Zymo Research™ (página 4).

4. 5.4.2. Purificación del ARN

Una vez extraído el ARN de las muestras de tejido hepático, se procedió a comprobar su calidad: concentración, pureza e integridad (explicado en la página 5).

4.5.4.3. Retrotranscripción

Una vez extraído el ARN y comprobada su calidad, se retrotranscribió para obtener el ADNc, utilizando el kit Prime Script™ *Reagent* (Perfect Real Time), explicado en la página 5.

4.5.4.4. qPCR

Una vez sintetizado el ADNc de cada una de las muestras, éste se puede utilizar como molde en la qPCR y se siguió el mismo protocolo descrito en la página 13.

4. 5. 5. Caracterización proteica de PCYOX1 por Western Blotting

El Western Blot o inmunoblot es una técnica analítica usada en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas de una mezcla compleja, como los extractos crudos de células o tejidos.

De este modo, una vez caracterizada la expresión hepática del ARNm de *Pcyox1*, se procede a realizar una caracterización proteica de PCYOX1 mediante Western Blot para comprobar si está sobreexpresada en los ratones tratamiento.

4.5.5.1. Extracción proteica

En primer lugar, se obtuvieron las muestras a partir de tejido hepático, partiendo de una alícuota de aproximadamente 50 mg. Una vez obtenidas las muestras, la extracción proteica se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- Se homogeneizó la muestra en un potter de cristal en 500 µl de sacarosa 0,25 M (d = 1,05 g/ml) con inhibidor de proteasas. El homogenado se centrifugó 5 minutos a 1632 rpm (280 g) y el sobrenadante con las proteínas se retiró a un segundo tubo eppendorf®. El pellet resultante con células enteras y restos de tejidos se desechó.

4.5.5.2. Determinación de la concentración proteica por el método de Bradford

La concentración de proteínas de cada muestra se evaluó mediante el método Bradford; un ensayo colorimétrico que se basa en el cambio de color del colorante Azul Coomassie brilliant blue G-250 que interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm.

Se prepararon diluciones 1:10, 1:25 y 1:50 de cada muestra y en una placa Sarstedt (Nümbrecht, Alemania) de 96 pocillos, se cargaron 2 µl por triplicado de concentración 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/ml de albúmina bovina (BSA) para realizar una recta de calibrado; así como 2 µl por duplicado de cada dilución preparada de cada muestra.

A continuación se añadieron 100 µl de reactivo Bradford BioRad protein assay diluido 1:5 a cada pocillo y se dejó incubó durante 10 minutos para después medir la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

Una vez determinadas las concentraciones proteicas de cada muestra, tanto de los animales control como de los tratamiento, se hicieron varios grupos de cada condición de acuerdo a su nivel de expresión del ARNm obtenido en la qPCR, de manera que la cantidad final de proteína fuera de 250 µg, completando el volumen con sacarosa 0,25 M.

4.5.5.3. Inmunodetección de PCYOX1

Para llevar a cabo la separación proteica, se hizo una electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida. Se prepararon los geles separador o inferior y concentrador o superior entre dos cristales. En primer lugar, se prepara el gel inferior, separador o resolving. Como PCYOX1 tiene un peso molecular de 63 kDa, se preparó un gel del 12% de acrilamida para que la proteína de interés quedara aproximadamente en el centro del gel.

Componentes para la preparación de 1 gel SDS-PAGE	
Reactivo	Gel separador (12%)
Acrilamida: Bisacrilamida al 30%	1,95 ml
Tampón inferior del gel	1,25 ml
Agua	1,8 ml
TEMED	4 µl
APS al 10%	34 µl

→ **Tabla 3:** Componentes para la preparación del gel separador de 1 gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida.

El tampón del gel inferior (Tris/HCl 1,39 M pH 8,8, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%) permite acondicionar la reacción de polimerización y obtener las condiciones óptimas de pH. El TEMED actúa como catalizador de la reacción de polimerización y, por último, el APS al 10% acelera la catálisis generando radicales libres.

El gel inferior se vertió entre los cristales y se añadió isopropanol para igualar el menisco y evitar la desecación de la parte superior del gel, además de favorecer la polimerización. Se dejó polimerizar durante 30 minutos. Una vez polimerizado, se eliminó el isopropanol y se añadió el gel concentrador introduciendo el peine adecuado para cargar las muestras.

Reactivos	1 gel concentrador
Acrilamida: Bisacrilamida al 30%	666 μ l
Tampón superior del gel (Tris/HCl 0,45 M, EDTA 8 mM y SDS al 0,4%)	1000 μ l
Agua	2,4 ml
TEMED	14 μ l
APS al 10%	40 μ l

→ **Tabla 4:** Componentes para la preparación del gel concentrador de 1 gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida.

Cuando finalizó la polimerización del gel superior, se retiraron con cuidado los peines y se limpiaron los pocillos para que las muestras pudieran ser cargadas más fácilmente y se colocó todo el conjunto en la cubeta de electroforesis añadiendo el tampón de electroforesis 1X (Tris/HCl 25 mM, Glicocola 0,96 M y SDS al 0,5%).

Cada muestra se diluyó en tampón de carga (Tris/HCl 0,045 M, EDTA 0,8 mM, SDS al 3%, glicerol al 10% (v/v), β -mercaptoetanol al 5% (V/v) y azul de bromofenol al 0,004%) y posteriormente se desnaturalizan a 95^o-100 °C durante 5-10 minutos, se incubaron en hielo 2 minutos para evitar la renaturalización y se centrifugaron brevemente. Se cargaron 22 μ g de proteínas en cada pocillo (12 μ l/pocillo) y el gel se dejó correr durante 3 horas a 80 V a temperatura ambiente.

Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante el método de transferencia semiseca. Para ello, el gel se incubó 15-30 minutos en tampón de transferencia 1X (Tris/HCl 25 mM con metanol al 10%) y por otro lado se cortaron membranas de PVDF y papeles Whatman del tamaño del gel. Las membranas se activaron por inmersión 15 segundos en metanol, 5 minutos de aclarado en agua y 10 minutos de equilibrado con el tampón de transferencia 1X. Los papeles Whatman también se empaparon con el tampón de transferencia 1X. Finalmente, se montó el sándwich encima del ánodo con 9 papeles Whatman, la membrana de PVDF, el gel y otros 9 papeles Whatman; se encajó el cátodo y se conectaron los electrodos en la posición correcta para dejar transcurrir la transferencia a 20V durante 30 minutos.

Tras la transferencia, los sitios no específicos de unión de las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (Tampón PBS (pH 7,4) con 5% BSA) 24 h a 4 °C en agitación suave.

Para la detección de PCYOX1 se utilizó como control de carga ACTINA (42 kDa). Para ello, se cortó la membrana a la altura de 50 kDa, la parte superior se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-PCYOX1 generado en conejo (Abcam, referencia ab124966) diluido

1:4.000 en Tween-PBS (PBS con 1% de Tween 20) con BSA al 2,5%. Para el control de carga, se incubó con anticuerpo primario policlonal anti-ACTINA generado en conejo (SIGMA, referencia A2066) diluido 1:2.000. La incubación se llevó a cabo con agitación suave (90 rpm) a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos.

Tras la incubación, se llevaron a cabo tres lavados de las membranas, de 10 minutos cada uno a 140 rpm, con PBS 0,1% Tween-20 a temperatura ambiente.

Tras ello, se incubó la membrana con los anticuerpos secundarios diluidos en el mismo tampón de bloqueo que para los anticuerpos primarios. La parte de arriba de la membrana se incubó a 90 rpm durante 1 hora con el anticuerpo secundario *goat anti-rabbit* de PCYOX1 (Thermo SCIENTIFIC, #Prod 35560) a una dilución 1:1.000.000 y la parte de abajo con el anticuerpo secundario *goat anti-rabbit* de ACTINA (Thermo SCIENTIFIC, #Prod SA5-35571), diluido 1:200.000. Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces en PBS 0'1% Tween-20 a temperatura ambiente

Una vez transcurrida la incubación, se lavaron tres veces durante 10 minutos con PBS 0,1% Tween-20 a 140 rpm. En este caso, se hace un último lavado con agua durante 2-3 minutos para eliminar los restos de detergente Tween-20 y se revelaron utilizando el sistema Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos).

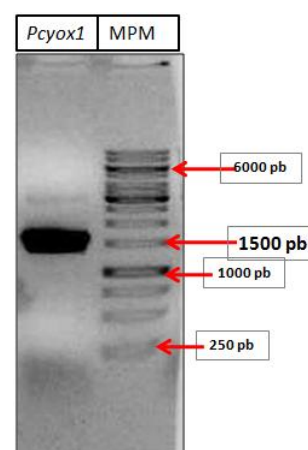
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se describen los resultados de los experimentos llevados a cabo.

5.1. Diseño del plásmido y clonaje de *Pcyox1*

5.1.1. Obtención de la secuencia codificante de *Pcyox1* mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa

Tras amplificar el gen *Pcyox1* del ADNc obtenido por retrotranscripción del ARNm hepático de ratones normales de la estirpe C57/6J, la banda esperada para *Pcyox1* era de 1,3 kb pero se obtiene una banda a la altura de la franja de 1500 pb del MPM Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Figura 3). Esto puede deberse a una gran cantidad de muestra o a que realmente el peso molecular de *Pcyox1* está mal anotado. Sin embargo, dado que salió una banda claramente mayoritaria se procedió a extraerla y clonarla. La aparición de otras bandas puede deberse a la presencia de isoformas de otras *Pcyox1* minoritarias.



→ **Figura 3.** Gel de agarosa al 1% de *Pcyox1* con el MPM Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

5. 1.2. Linearización del plásmido pLIVEIRESluc

Para linearizar el plásmido pLIVEIRESluc, se llevó a cabo una digestión con la enzima de restricción *Bam*HI. En la Figura 4 se puede observar que se ha realizado la extracción del plásmido linearizado del gel de agarosa al 0,8% a la altura de 6,6 kb (el plásmido pLIVEIRESluc tiene un peso de 6658 pb). La segunda banda del MPM de 1 kb corresponde a 8000 pb y la tercera banda a 6000 pb (Figura 2, B).

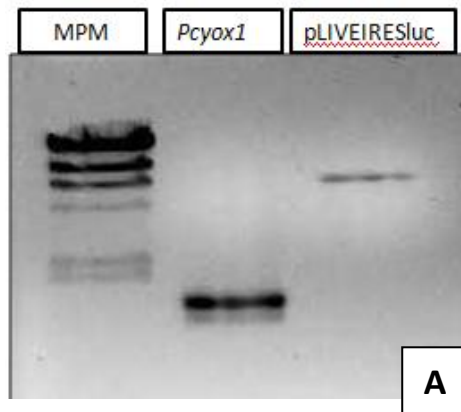
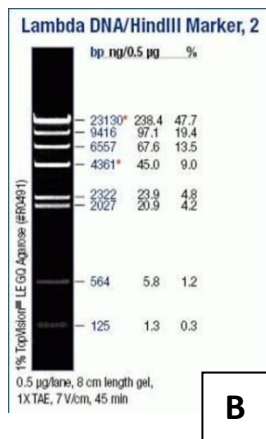
Se observa que la banda extraída es de tamaño mucho mayor que la del plásmido puesto que se corta y extrae del gel la mayor cantidad posible para no perder material.



→ Figura 4. Gel de agarosa al 0,8% del plásmido pLIVEIRESluc y recorte de éste.

5.1.3. Cuantificación de inserto + plásmido

Se comprueba que el inserto y el plásmido aparecen a la altura correspondiente, 1,3 y 6,6 kb respectivamente, según el MPM (Figura 5, B). Teniendo en cuenta que se cargó 500 ng de MPM y que cada una de las bandas tiene una cantidad de ADN conocido, en función de las intensidades de las bandas podemos la concentración y el tamaño del inserto y del plásmido.

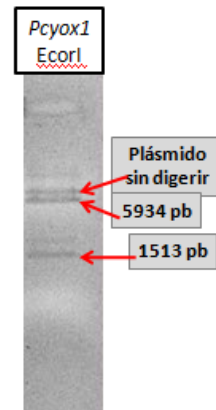


→ Figura 5. A, Gel de agarosa al 0,8% para cuantificación del inserto (*Pcyox1*) y del plásmido pLIVEIRESluc; B, MPM Lambda DNA / HindIII.

5.2. Análisis de las colonias mediante enzimas de restricción

*Eco*RI tiene tres sitios de restricción para pLIVEPcyox1IRESluc, de manera que corta en un sitio dentro del inserto y en dos sitios del plásmido fuera del inserto generando tres fragmentos de 539, 1513 y 5934 pb. Así, se asegura que el plásmido contenía el inserto.

En la figura 6 se comprueba la presencia de una banda en torno a los 6000 pb correspondiente al corte de 5934 pb y la banda que aparece por arriba se debe a restos de plásmido que han quedado sin digerir. Abajo se aprecia una banda entre las bandas de 2000 y 1500 pb, correspondiente al corte que genera el fragmento de 1513 pb y finalmente, el último corte que genera el fragmento de 539 pb no se aprecia porque el gel se dejó correr mucho tiempo y puede que la banda se haya escapado del frente.



→ **Figura 6.** Resultado del análisis de las colonias mediante enzimas de restricción (*EcoRI*) en un gel de agarosa al 1%

5.3. Secuenciación Sanger

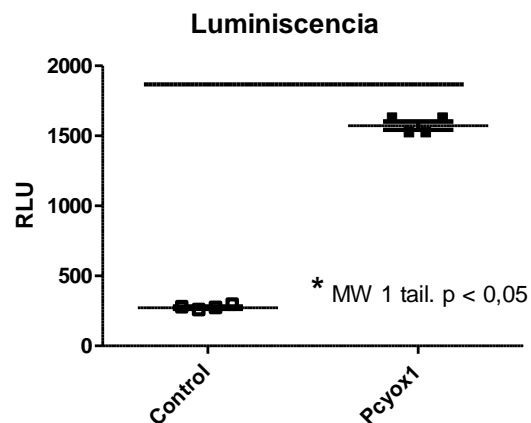
La secuenciación fue llevada a cabo en la unidad de genómica funcional del CIBA, a las cuales se mandó una muestra de plásmido a concentración de 100 ng/ul y un PrD que hibridaba en el promotor pLIVE y un PrR que hibridaba en el inserto. Ambos *primers* a concentración de 5 mM.

Las secuencias obtenidas se alinearon al 99% con el gen de estudio mediante el programa NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De esta manera, se puede afirmar que el plásmido alberga *Pcyox1*.

5.4. Valoración funcional del plásmido en cultivo celular HepG2

5.4.1. Estudio actividad luciferasa

Los resultados que se muestran a continuación (Figura 7) evidencian una clara sobreexpresión de *Pcyox1* en las células en las que se ha inyectado el plásmido pLIVE*Pcyox1*IRES*luc*, dado que el promotor del plásmido controla tanto la expresión de la luciferasa como de *Pcyox1*, por lo que si se ha sobreexpresado la luciferasa (hay luminiscencia en el animal tratamiento), también se habrá sobreexpresado *Pcyox1*. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test U de *Mann-Whitney one tail* ($p < 0,05$) con el programa *GraphPad Prism 5* (explicado en la sección Anexo).



→ **Figura 7.** Expresión de luciferasa en cultivo celular HepG2 mediante el método de la luciferina para situaciones control y tratamiento. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test U de *Mann-Whitney one tail* ($p < 0,05$) con el programa *GraphPad Prism 5*. La cantidad de luz como la mide el espectrómetro está expresada en RLU (Unidades Relativas de Luminiscencia, del inglés *Relative Luminiscence Units*)

5.4.2. Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR

Tras la extracción del ARN se valoró la calidad del mismo obteniendo una concentración de 82 ng/μl y un ratio de pureza de 1,9. La electroforesis en gel de agarosa al 1% demostró la integridad del ARN apareciendo tres bandas correspondientes al ARN ribosómico eucariota (5 S, 18 S y 28 S).

El resultado de la qPCR se normalizó con el gen *housekeeping* de la ciclofilina B y los datos se representaron en forma de potencia para poder compararlos: potencia $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Tabla 5). Se obtuvieron unas diferencias de expresión significativas entre control y *Pcyox1*.

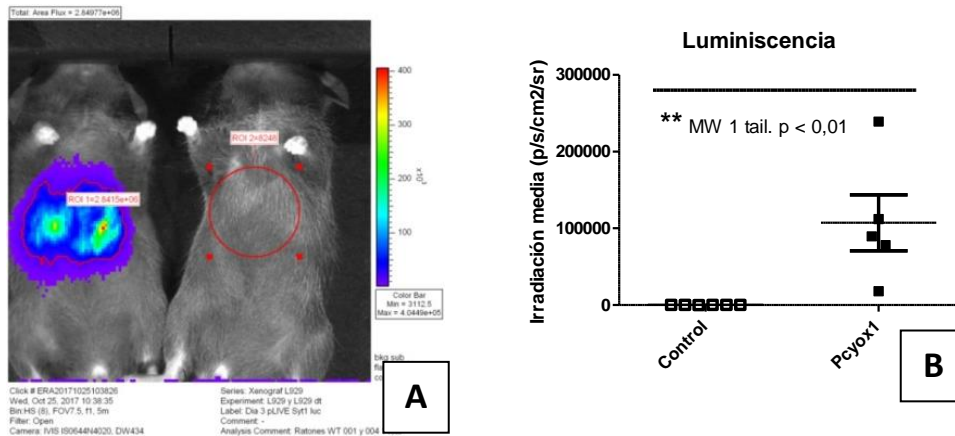
	Potencia ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Control	1
<i>Pcyox1</i>	16633

→ **Tabla 5:** Resultado de la qPCR llevada a cabo en cultivo celular HepG2. El $\Delta\Delta Ct$ proviene del cálculo de la variación del C_T del grupo control y se restó este valor a todas las muestras después de haberlas normalizado con el gen *housekeeping*.

5.5. Sobreexpresión de *Pcyox1* en el ratón.

5.5.1. Medida actividad luciferasa

Los resultados que se muestran en la Figura 10 prueban la sobreexpresión de *Pcyox1* en los animales tratamiento en los que se ha inyectado el plásmido pLIVEPcyox1IRESLuc, dado que se ha sobreexpresado la luciferasa (explicado página 21) ya que hay un aumento de luminiscencia en los animales tratamiento, aunque la diferencia no es tan significativa como en el caso de los modelos celulares y hay más variabilidad entre los animales tratamiento.

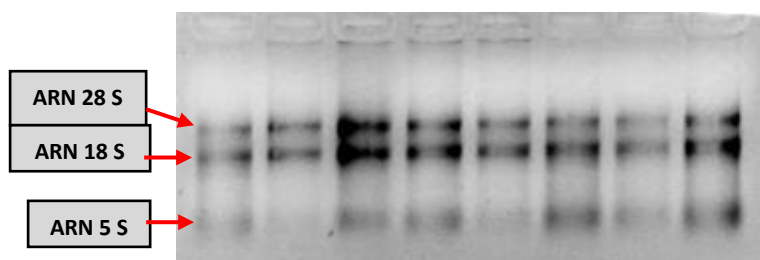


→ **Figura 10. A,** Expresión de luciferasa en modelo experimental de ratón mediante el método de la luciferina viendo a la izquierda un animal tratamiento y a la derecha un animal control; **B,** Gráfica de la captación de luz para animales tratamiento y control. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test U de *Mann-Whitney one tail* ($p < 0,01$) con el programa GraphPad Prism 5 y se expresa la luminiscencia media de cada animal.

5.5.2. Extracción y purificación del ARN

Tras la extracción hepática del ARN se midió la concentración y pureza (ratio 260/280 nm) de cada una de las muestras, siendo adecuadas para continuar con la retrotranscripción y qPCR y se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 1%, observando las bandas correspondientes al ARN ribosómico eucariota (28 S, 18 S y 5 S), corroborando que las

muestras de ARN están en buenas condiciones y no ha habido degradación durante la extracción y se continua con el estudio.



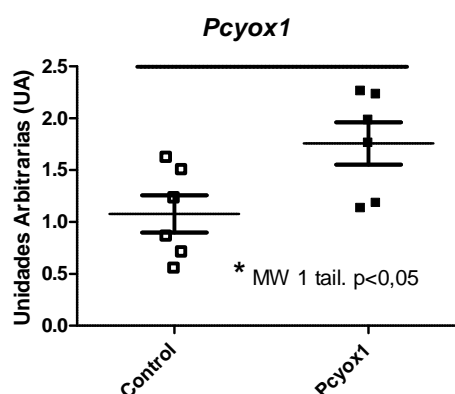
→ Figura 11. Gel de agarosa al 1% para medir la integridad del ARN tras la extracción y purificación

5.5.3. Retrotranscripción y qPCR

Después de medir la calidad, integridad y pureza del ARN extraído, se retrotranscribió a ADNc y se llevó a cabo la qPCR. Tras normalizar los resultados de la qPCR con los datos obtenidos de la ciclofilina B como gen *housekeeping* se hizo un análisis estadístico mediante el test U de *Mann-Whitney one tail* con el programa GraphPad Prism 5.

En la Figura 12 se pueden observar los resultados en los que se comprueba la existencia de diferencia de expresión entre el control y el tratamiento, confirmando la sobreexpresión de *Pcyox1* y la funcionalidad del plásmido pLIVEPcyox1IRESLuc.

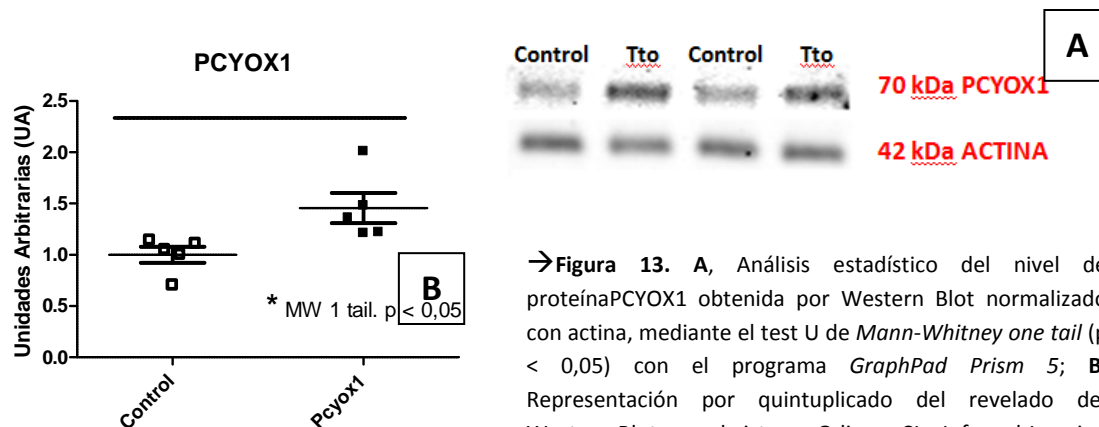
Se observa solapamiento de algunos controles, cuya expresión de *Pcyox1* era muy alta, con los animales tratados. Esto puede ser debido a la dieta esteatósica ya que como se comprobó en estudios posteriores del grupo, esta dieta aumenta la expresión de *Pcyox1* (resultados no publicados).



→ Figura 12. Análisis estadístico del ADNc obtenido por retrotranscripción del ARN hepático extraído, mediante el test U de *Mann-Whitney one tail* ($p < 0,05$) con el programa GraphPad Prism 5.

5.5.4. Western Blot

Para confirmar la sobreexpresión se prosiguió con el análisis a nivel proteico de PCYOX1 mediante Western Blotting. En la Figura 13 se comprueba mediante el test U de *Mann-Whitney one tail* ($p < 0,5$), de la misma manera que a nivel de ARNm, la sobreexpresión de PCYOX1 en los animales tratamiento en los que se inyectó el plásmido pLIVEPcyox1IRESLuc. Los resultados están normalizados con el control de carga actina (42 kDa).



6. CONCLUSIONES

1. Se ha generado un plásmido que coexpresa el gen de interés junto con la luciferasa
2. La secuenciación Sanger demuestra que el diseño de cebadores es adecuado y el inserto *Pcyox1* se ha amplificado y clonado en el plásmido pLIVEIRESLuc correctamente.
3. El cultivo celular es de gran ayuda preliminar para verificar la funcionalidad del plásmido, previo a los estudios en modelos animales de experimentación. Se comprueba una sobreexpresión de *Pcyox1* en las células transfectadas con el plásmido pLIVEPcyox1IRESLuc.
4. El gen codificante de luciferasa es útil a la hora de valorar el funcionamiento del plásmido, previa toma de muestras para evitar sacrificios de modelos experimentales sin transfectar.
5. La inyección hidrodinámica permite sobreexpresar *Pcyox1* en el hígado de manera específica, con entrada suficiente de plásmido.
6. El promotor pLIVE funciona satisfactoriamente para dirigir el inserto *Pcyox1* de manera específica a hígado.
7. La qPCR permite valorar la sobreexpresión de *Pcyox1* hepática en los animales tratamiento respecto a los animales control.
8. El Western Blot ratifica a nivel proteico la sobreexpresión de PCYOX1, obteniendo resultados similares a los del ARNm.
9. En todos los casos hay una cierta expresión de *Pcyox1* en los animales control mostrando una expresión normal hepática de *Pcyox1*. Sería interesante repetir el experimento con una dieta baja en grasa ya que un experimento posterior del grupo comprobó que la dieta rica en grasa aumentaba la expresión de *Pcyox1*.

10. Se ha logrado una sobreexpresión hepática de *Pcyox1* que se comprueba mediante luminiscencia, ARN y proteína.

CONCLUSIONS

1. It has been generated a plasmid to express any gene of interest together with luciferase.
2. Sanger sequencing proves that the primer design is suitable and the *Pcyox1* insert has been amplified and correctly cloned into the pLIVEIRESLuc plasmid.
3. Cell culture is of great preliminary help to verify the functionality of the plasmid, prior to studies in animal models of experimentation. *Pcyox1* overexpression is confirmed in the cells transfected with the pLIVEPcyox1IRESLuc plasmid.
4. Luciferase-encoding gene is useful in assessing the functioning of the plasmid, prior taking samples to avoid sacrifices of experimental models without transfecting.
5. Hydrodynamic injection allows for specific overexpressing *Pcyox1* in the liver, with enough entry of plasmid.
6. pLIVE promoter works satisfactorily to direct the *Pcyox1* insert specifically to liver.
7. qPCR allows to evaluate the hepatic overexpression of *Pcyox1* in the treatment animals with respect to the control animals.
8. Western Blot tests confirms at a protein level the overexpression of PCYOX1, obtaining similar results to the mRNA.
9. In any case, there is a certain expression of *Pcyox1* in the control animals showing a normal hepatic expression of *Pcyox1*. It would be interesting to repeat the experiment with a low-fat diet due to a later experiment in the group found that the high-fat diet increased the *Pcyox1* expression.
10. Hepatic overexpression of *Pcyox1* has been achieved, which has been verified by luminescence, mRNA and protein levels.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera-Marcos, L. V, Lou-Bonafonte, J. M., Martinez-Gracia, M. V, Arnal, C., Navarro, M. A., & Osada, J. (2018). Prenylcysteine oxidase 1, a pro-oxidant enzyme of low density lipoproteins. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23, 1020–1037. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930587>
2. Zhang, L., Tschantz, W. R., & Casey, P. J. (1997). Isolation and characterization of a prenylcysteine lyase from bovine brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (37), 23354–23359. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.37.23354>

3. Tschantz, W. R., Digits, J. A., Pyun, H. J., Coates, R. M., & Casey, P. J. (2001). Lysosomal prenylcysteine lyase is a FAD-dependent thioether oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (4), 2321–2324. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000616200>
4. Gene: PCYOX1 (ENSG00000116005) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 92. (n.d.). Retrieved May 5, 2018, from http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000116005;r=2:70257386-70281191;t=ENST00000414812 (2018)
5. The Weizmann Institute of Science: Prenylcysteine Oxidase 1. Retrieved May 1, 2018, from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PCYOX1&Key Words=PCYOX1> (2018)
6. GTEx Portal. (n.d.). Retrieved May 1, 2018, from <https://www.gtexportal.org/home/gene/PCYOX1> (2018)
7. Tissue expression of PCYOX1 - Summary - The Human Protein Atlas. (n.d.). Retrieved June 17, 2018, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116005-PCYOX1/tissue>
8. Tschantz, W. R., Zhang, L., & Casey, P. J. (1999). Cloning, expression, and cellular localization of a human prenylcysteine lyase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35802–35808.
9. Mancone, C., Amicone, L., Fimia, G. M., Bravo, E., Piacentini, M., Tripodi, M., & Alonzi, T. (2007). Proteomic analysis of human very low-density lipoprotein by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF. *Proteomics*, 7(1), 143–154. <http://doi.org/10.1002/pmic.200600339>
10. Surra, J. C., Barranquero, C., Torcal, M. P., Orman, I., Segovia, J. C., Guillén, N., ... Osada, J. (2013). In comparison with palm oil, dietary nut supplementation delays the progression of atherosclerotic lesions in female apoE-deficient mice. *British Journal of Nutrition*, 109(02), 202–209. <https://doi.org/10.1017/S000711451200092X>
11. Huang, Y., Tanimukai, H., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., & Gong, C. X. (2004). Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *European Journal of Neuroscience*, 20 (12), 3489–3497. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03852.x>
12. PCYOX1 protein (human) - STRING interaction network. (n.d.). Retrieved May 6, 2018, from <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=EsPAgWJm3vzR> (2018)
13. Polymerase Chain Reaction (PCR). (n.d.). Retrieved June 17, 2018, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
14. Sendra, L., Herrero, M., & Aliño, S. (2018). Translational advances of hydrofection by hydrodynamic injection. *Genes*, 9 (3), 136. <https://doi.org/10.3390/genes9030136>
15. Liu, F., Song, Y. K., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6 (7), 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>

8. ANEXO

1. Diseño de cebadores para la obtención de la secuencia codificante de *Pcyox1* mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa

	Secuencia	Longitud (pb)	GC (%)	Tm (°C)	Tm específica del gen (°C)
PrD	5'- TCGACTCCCGGGATC AGGC CATGGGGCGCTTCG -3'	33	69,7	73,5	64,2
PrR	5'- CGAGAGCTCTGGATC GAG GGGCAGTGCTCAGTTACAGC-3'	38	60,5	69,6	62

2. Secuencias de los cebadores de la RT-qPCR

Estas son las secuencias de los cebadores utilizados para la RT-qPCR de acuerdo a las guías MIQE:

Símbolo del gen	Código de acceso		Secuencia	Amplificación	Posición	Concentración	Eficiencia
<i>Ppib</i>	NM_000942.4	Directo	5'-CGAGTCGTCT TTGGACTCTTTG-3'	182 nt	Exón 2-3	100 nM	90 %
		Reverso	5'-TAGATGCTCTTT CCTCCTGTGC-3'				
<i>Pcyox1</i>	NM_025823.4	Directo	5'-GGTTCAGTCATT CACCCCCTAA-3'	320 nt	Exón 2-3	250 nM	101 %
		Reverso	5'-TACAAACCAGC TGCTCTCCTCA-3'			300 nM	

3. Secuencias de los cebadores para la secuenciación Sanger

	Secuencia	Concentración	Tm
PrD (hibrida con el promotor pLIVE)	5'- TTCCTATCAACCCCACTA GCCTCT -3'	5 mM	59,1 °C
PrR (hibrida con el inserto <i>Pcyox1</i>)	5'- TACAAACCAGCTGC TCTCCTCA -3'	5 mM	58,1 °C

4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *GraphPad Prism 5*, en el que se realizó el test U de *Mann-Whitney* de una cola. Esta prueba no paramétrica permite comparar dos grupos independientes como una alternativa al test *t de Student* sobre diferencias de medianas cuando no se cumplen las hipótesis de distribución normal y/o homogeneidad de varianzas. De esta manera, se pudo comprobar la similitud de dos muestras ordinales (los animales control y los animales tratados con pLIVE*Pcyox1*IRESLuc).