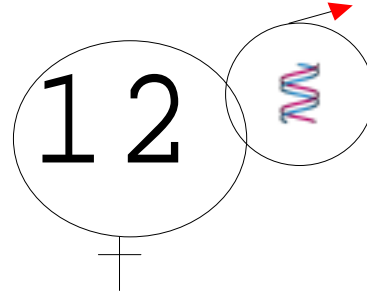


MÉTODOS Y APLICACIONES DEL ADN RECOMBINANTE

Estela Morales Peralta



Como ya fue estudiado, la aplicación de las técnicas citogenéticas permiten identificar las alteraciones cromosómicas, numéricas y estructurales, así como interesantes mecanismos biológicos que explican la patogenia de muchas enfermedades. Para conocer la localización y caracterización de los genes que se expresan como caracteres diversos del organismo humano, normales y patológicos, se requiere de la aplicación de las técnicas del ADN recombinante, que incluyen dos tipos principales: las de clonación y las de análisis del ADN. Estos procederes han revolucionado la Genética Médica, ampliando las posibilidades diagnósticas y la esperanza en una nueva terapéutica.

En este capítulo se analizan las herramientas en las cuales se basa esta nueva tecnología, las principales técnicas que se aplican, su interpretación y la utilidad de estos procederes en el análisis de ligamiento en humanos.

CLONACIÓN DEL ADN

Se nombra clonación a todos aquellos procedimientos que tienen como objetivo obtener múltiples copias idénticas (o casi idénticas) de moléculas, células, etc. Estos procedimientos son indispensables cuando se necesita tener un número grande de moléculas o células para estudios posteriores. Así, la clonación del ADN se refiere a los procedimientos encaminados a obtener numerosas copias idénticas (o casi idénticas) de un fragmento específico de ADN. En general, estos procedimientos son de dos tipos: Los realizados *in vivo* y los que se hacen *in vitro*. La clonación *in vivo* es aquella que se realiza en organismos vivos (casi siempre microorganismos) para la reproducción del ADN. Por su parte la clonación *in vitro* emplea componentes celulares aislados para realizar este propósito. El procedimiento por excelencia que para la clonación *in vitro* es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction). A continuación se describen los fundamentos de estos dos procedimientos.

Clonación in vivo

Para la clonación in vivo, el ADN que se desea clonar se transfiere a una célula con la ayuda de un vector. El vector es otra molécula de ADN que tiene la propiedad de poder replicarse de forma autónoma. Cuando se usa solamente con este propósito recibe el nombre de vector de clonación. Para la formación del vector de clonación además de las moléculas de ADN se requiere del uso de enzimas de restricción y de ADN ligasas.

Enzimas de restricción y ligasas. Su papel en la clonación

Las enzimas de restricción son endonucleasas de origen bacteriano, que constituyen en estos organismos un mecanismo de defensa contra los ADN extraños. Existen al menos tres tipos de estas enzimas, pero las más empleadas en la construcción de vectores son las de tipo II, porque cortan el ADN de doble hebra en determinados sitios de una secuencia específica de nucleótidos. Estas secuencias suelen ser palindrómicas, es decir, secuencias idénticas en ambos sentidos de las dos hebras del ADN. Son isoesquizómeros aquellas enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia. La mayoría de las enzimas de restricción de tipo II reconocen sitios de 4 a 6 pares de bases.

En la actualidad se conocen más de 1000 enzimas de restricción. La tabla número 12.1 ilustra los sitios de corte de alguna de ellas. Las enzimas de restricción se nombran de acuerdo con el microorganismo de donde provienen. La primera letra, en mayúsculas, es la inicial de la especie; las dos letras siguientes, en minúsculas, el género, seguidas por un número romano de acuerdo con el orden de su descubrimiento. De acuerdo con la forma en que las enzimas cortan al ADN dentro del sitio de reconocimiento se originan dos tipos de extremos. Si el corte se produce en el mismo lugar en las dos hebras se forman extremos romos, pero si se produce en lugares diferentes genera un pequeño sector monofibrilar conocidos como extremos cohesivos. (Figura 12.1). Estos segmentos monofibrilares pueden contener bien el extremo 3' bien el 5'.

Cuando se exponen moléculas de ADN de distintos orígenes a una misma enzima de restricción, que genere extremos cohesivos, se producen fragmentos que son complementarios. Si estos ADN se ponen en contacto esos sectores complementarios tienden a aparearse y las dos moléculas pueden ser unidas. Para esto último se requiere de enzimas ADN ligasas que catalizan la unión de fragmentos de ADN donde solamente falte un enlace fosfodiéster, si estas hebras forman parte de una molécula bifibrilar. La unión de estos fragmentos de ADN de distinto origen produce lo que se conoce como *ADN recombinante*.

Vector

Un vector es una molécula de ADN que puede replicarse autónomamente dentro de una célula hospedera, de la cual puede aislarse de forma pura para su análisis. La clonación de fragmentos de ADN humano en un vector, permite la multiplicación del mismo en millones de copias, ya que el vector que se replica puede producir un alto número de copias por cada célula y porque la bacteria o levadura puede crecer indefinidamente en el laboratorio. Entre los principales vectores se encuentran: los plásmidos, los bacteriófagos y los cromosomas artificiales de levadura o YAC (del inglés yeast artificial chromosome). Estos vectores difieren, entre otras características, en el tamaño del ADN de interés que permiten insertar para obtener las copias deseadas (Figura 12.2).

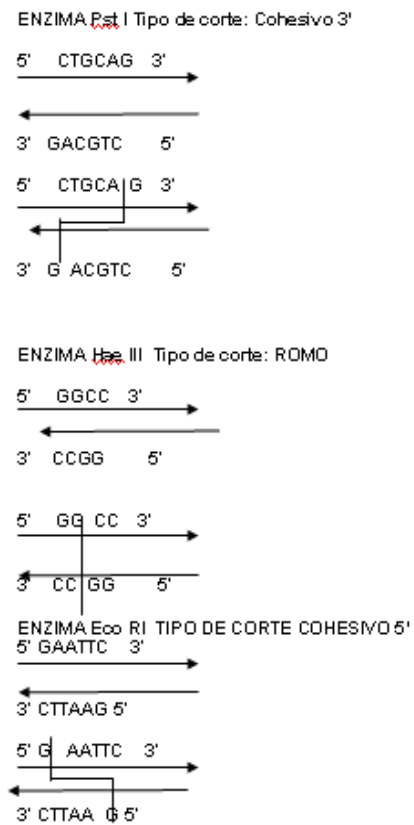


Figura. 12.1. Tipos de corte de las enzimas de restricción. Observe que la secuencia de bases de ambas hebras del ADN son idénticas en relación al eje de corte, por ello se dice que las secuencias son palindrómicas.

Tabla 12.1 Enzimas de restricción

NOMBRE DE LA ENZIMA	BACTERIA DE ORIGEN	SECUENCIA RECONOCIDA Y PUNTOS DE CORTE (1)	TIPO DE EXTREMOS
Bal I	<i>Brevibacterium albidum</i>	-T-G-G/C-C-A- -A-C-C\G-G-T-	Romos
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	-G/G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G\G-	Cohesivos, cola 5'
Eco RI	<i>Escherichia coli</i> EY13	-G/A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A\G-	Cohesivos, cola 5'
Hae III	<i>Haemophilus aegyptus</i>	-G-G/C-C- -C-C\G-G-	Romos
Hin dIII	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-A/A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A\A-	Cohesivos, cola 5'
Not I	<i>Norcadia otiditis caviarum</i>	-G-C/G-G-C-C-G-C- -C-G-C-C-G-G\G-G-	Cohesivos, cola 5'
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	-C-T-G-C-A/G- -G\A-C-G-T-C-	Cohesivos, cola 3'
Pvu II	<i>Proteus vulgaris</i>	-C-A-G/C-T-G- -G-T-C\G-A-C-	Romos
Sma I	<i>Serratia marcescens</i> Sb	-C-C-C/G-G-G- -G-G-G\G-C-C-	Romos
Xho I	<i>Xantomonas holcicola</i>	-C/T-C-G-A-G- -G-A-G-C-T\C-	Cohesivos, cola 5'

Los plásmidos son moléculas de ADN circulares que se replican de forma independiente al ADN cromosómico en bacterias y levaduras. Son portadores de genes no cromosómicos entre ellos aquellos que confieren resistencia a antibióticos, característica muy aprovechada para identificarlos. Los plásmidos pueden incorporar fragmentos de ADN hasta de 10 kb de longitud.

Los bacteriófagos son virus compuestos por un ADN de doble hebra relativamente largo, cubierto por proteínas. Infeccionan las bacterias al inyectar su ADN y dejando fuera de la bacteria sus proteínas. Aprovecha el aparato metabólico de la bacteria para la replicación de su ADN. Los bacteriófagos admiten ADN extraño hasta de 50 kb de longitud.

Los cromosomas artificiales de levadura o YAC constan de todos los elementos necesarios para su replicación, como son, las secuencias de replicación autónoma, los centrómeros y los telómeros. En ellos se han logrado insertar moléculas de ADN de varios centenares de kb.

Transformación del organismo huésped y obtención del ADN específico

Cuando un vector ha sido bien construido su introducción en una célula determinada provoca cambios en el fenotipo de ésta, fenómeno conocido como transformación. El fenotipo transformado es el que permite identificar cuales células han captado el vector y cuales no. Por ejemplo, si una célula es sensible a la tetraciclina y el vector contiene un gen de resistencia a ese antibiótico se produce la transformación de una célula sensible en una resistente. Serían las células resistentes a la tetraciclina las que incorporaron el vector de clonación que fue diseñado. Una vez dentro de la célula el vector se replica y su resultado es la obtención de múltiples copias del ADN de interés.

Como la membrana de estos organismos generalmente no es permeable a grandes moléculas, se requiere su modificación mediante la exposición a ciertas sales de calcio o voltajes elevados para lograr la penetración del vector. Este ADN recombinante se replica en las células huéspedes, colocadas en medio de cultivo adecuado, hasta lograr tener el número deseado de copias idénticas (Figura 12.2).

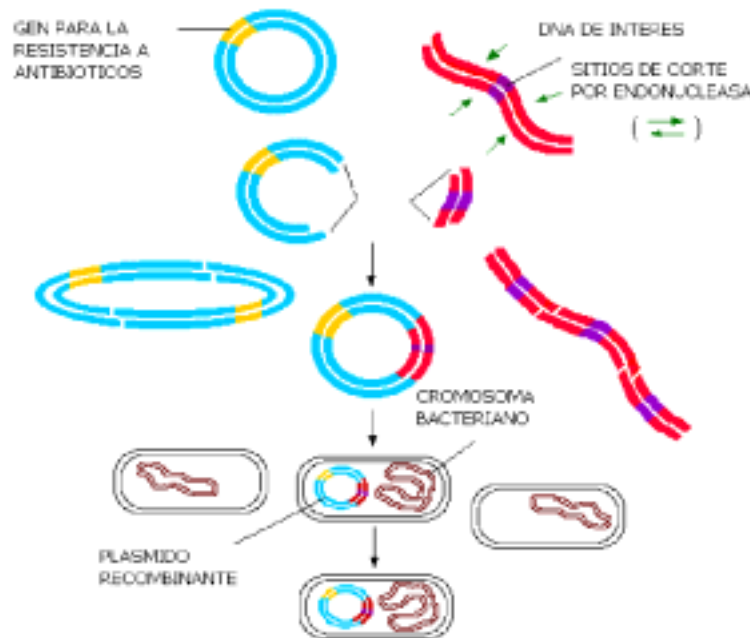


Figura. 12.2. Si se expone el ADN de interés y el vector a la misma enzimas de restricción que generen extremos monofibrilares pueden unirse una a otra a sus secuencias complementarias mediante la acción de enzimas ligasas lo que crea una molécula de ADN recombinante, es decir, de dos orígenes distintos: el vector y la secuencia de interés, que puede ser humana.

Para poder seleccionar las células que han incorporado el vector, éste habitualmente se construye en ADN que contienen genes de resistencia a determinados antibióticos. Por ejemplo, puede construirse el vector con un plásmido que porta los genes que confieren resistencia a la tetraciclina y a la ampicilina. Se selecciona la enzima de restricción que corte el ADN precisamente en el interior de uno de estos genes (digamos el de la tetraciclina). Si se toma como hospedera una bacteria sensible a ambos antibióticos se logrará la transformación deseada pues aquellas que incorporen el plásmido se transforman en resistentes a la ampicilina. Si las bacterias se hacen crecer en un medio al cual se ha añadido la ampicilina, solamente podrán crecer adecuadamente las células que incorporaron el plásmido. Las bacterias que incorporaron el plásmido donde no se produjo la recombinación, serán resistentes a ambos antibióticos. Para identificarlos se hace una réplica de la placa de cultivo. Colocando un material absorbente (puede ser papel de filtro) sobre la placa para que algunas bacterias se adhieran a él y después cuidadosamente, se colocan sobre otra placa de cultivo que contiene la tetraciclina. Las colonias que aparecen en la placa original y que no aparecen en la replica son las sensibles a la tetraciclina y por lo tanto las que incorporaron el vector. Estas colonias se siembran de nuevo en un medio enriquecido para lograr su rápido crecimiento.

Las colonias de bacterias que poseen una secuencia específica pueden ser seleccionadas también al transferir su ADN a filtros de nitrocelulosa, y desnaturalizarlos para obtener ADN de una sola hebra, que se pueden hibridar con *oligonucleótidos* marcados radioactivamente (*sondas moleculares*) y así detectar las colonias que contienen la secuencia específica y cultivarlas aparte. Las *sondas moleculares* son moléculas de ADN de una sola hebra que se obtienen por síntesis artificial a partir de sus nucleótidos componentes. Las sondas se utilizan para localizar una secuencia específica de ADN. Al desnaturalizarse el ADN sus dos hebras se separan, si se añade una sonda cuya secuencia sea complementaria a un sector de ese ADN, la sonda se unirá al mismo por complementariedad de bases. Como la sonda está marcada con isótopos radiactivos o reactivos fluorescentes, se puede localizar con relativa facilidad.

MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Los métodos de análisis molecular difieren de acuerdo con el tipo de molécula al cual se aplican, ADN, ARN o proteínas. Entre ellos se encuentran:

- Para el análisis del ADN se aplican fundamentalmente:
 - . Método de Southern (Southern blotting).
 - . Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
 - . Los estudios de ligamiento.
 - . La secuenciación.
- Para el estudio de ARNm:
 - . Northern blotting.
- Para el estudio de las proteínas:
 - . Western blotting.

Los estudios moleculares pueden ser directos o indirectos. Se practican estudios moleculares directos cuando el objetivo es la búsqueda o identificación de las mutaciones específicas, tal como se realiza en los siguientes procedimientos:

- Southern Blotting para detectar deleciones en genes.
- Southern Blotting y análisis con enzimas de restricción para detectar mutaciones puntuales que alteran sitios de restricción.
- Reacción en cadena de la polimerasa, ya sea seguida de digestión por enzimas de restricción, o amplificación alelo específica, para detectar mutaciones previamente caracterizadas.

Son ejemplo de pruebas moleculares indirectas las realizadas por ligamiento usando los polimorfismos de ADN como marcadores moleculares. Ampliemos más en los fundamentos de estas técnicas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1985 Saiki Mullis y sus colaboradores describieron una técnica conocida como PCR, que consiste en la amplificación in vitro de secuencias específicas de ADN. Mediante este procedimiento se pueden generar grandes cantidades de un fragmento de ADN, a partir de una cantidad mínima del mismo. Por lo tanto el PCR es una forma de clonación in vitro de un segmento de ADN.

Se basa en la propiedad que tiene las dos cadenas de ADN de disociarse y reasociarse por calentamiento y enfriamiento. Consiste en la práctica en ciclos que constan de las siguientes etapas (Figura 12.3):

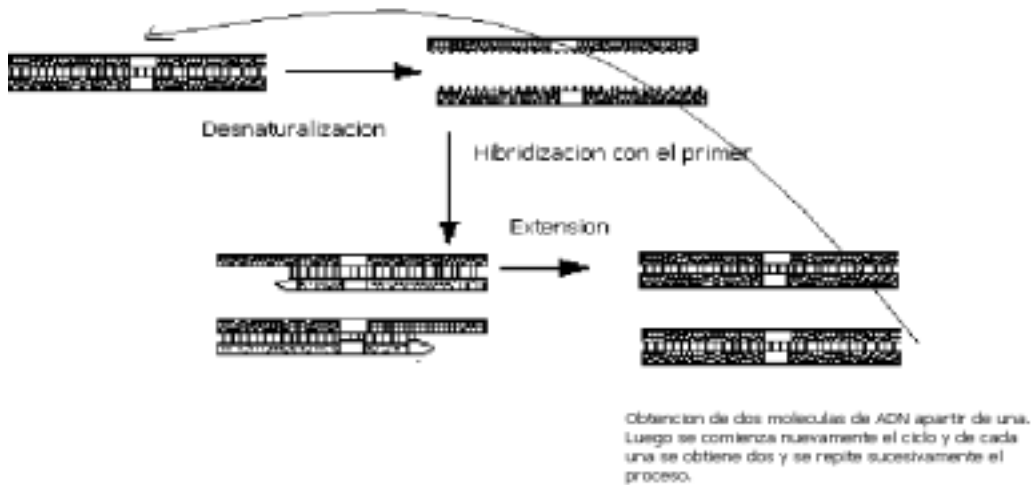


Figura 12.3. Reacción de la cadena de la polimerasa. Observe que de acuerdo con el número de ciclos efectuados el número de copias de ADN aumenta en progresión geométrica.

1. La desnaturalización: Es la primera fase del ciclo, se separa la doble cadena de ADN por calor (aproximadamente 94 °C).
2. Alineamiento o hibridación: Es la unión con los dos cebadores a sus secuencias complementarias. Los cebadores o primers hibridan de forma específica, o sea, se unen a las dos hebras complementarias del segmento de ADN que se desea amplificar, de forma que flanquean sus extremos; es decir, sirven para definir los extremos del segmento de ADN. La mayoría de los cebadores contienen entre 18 y 30 bases. Si bien pueden ser diseñados manualmente en la mayoría de los casos se utilizan programas informáticos.
3. Síntesis o extensión de ADN: Una ADN polimerasa en presencia de exceso de trifosfatos de desoxirribonucleótidos alarga los cebadores incorporando los desoxinucleótidos cuyas bases sean complementarias a la hebra que le sirve de molde. La ADN-polimerasa más utilizada en el PCR es la que se obtiene del microorganismo *Thermus aquaticus* (llamada Taq polimerasa). Esta enzima es termoestable lo que le permite la síntesis del ADN a temperaturas por encima de los 70 °C y resiste los 94-95 °C, necesarios para la fase de separación de las dos hebras de ADN. Las etapas de hibridación y síntesis requieren una temperatura más baja que puede estar entre 50-60 °C y 72 °C, para una y otra, respectivamente.

El número de ciclos de un PCR depende de la cantidad de ADN del que se parte y las cantidades finales, pero no debe ser mayor de 50. Con sólo 20 a 30 ciclos del proceso descrito, se pueden obtener varios millones de copias de la secuencia de interés, flanqueada por los cebadores utilizados en la amplificación.

Si bien la reacción de PCR se puede realizar manualmente, en los últimos años se ha generalizado el uso de termocicladores programados, mediante los cuales se logra la automatización de este proceso en menos de 3 horas.

Los productos que se obtienen del PCR pueden separarse mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. La selección de uno u otro depende del tamaño de los segmentos a separar, los que se visualizan generalmente con bromuro de etidio o tinción con plata.

Una vez obtenida la secuencia de ADN amplificada por PCR, se debe proceder a la identificación de mutaciones o variantes polimórficas puntuales por medio de análisis con enzimas de restricción. En este caso, la presencia de la mutación en el ADN problema se visualizará por la pérdida o ganancia de un fragmento de restricción, según si la mutación destruya o cree una diana para la enzima utilizada. También pueden utilizarse cebadores específicos para cada alelo, no requiriendo estas técnicas el uso de enzimas de restricción.

Una de las principales desventajas del PCR es la posibilidad de contaminación, lo cual debe tener presente quien desarrolle esta técnica.

Aplicaciones del PCR

Tiene una utilidad extraordinaria para el diagnóstico preciso de los trastornos hereditarios cuyos defectos moleculares hayan sido definidos. También se ha aplicado en la detección de patógenos infecciosos y la identificación de heterogeneidad genética asociada a enfermedades.

Con la reacción en cadena de la polimerasa, se pueden realizar estudios con escaso material genético, como pueden ser gotas de sangre seca, pelos, semen, etc., así como muestras de archivo, como bloques de tejidos en parafina y fijados en formol, lo que permite importantes trabajos retrospectivos y una amplia aplicación en técnicas forenses.

Método de Southern (Southern Blotting)

Este método fue descrito por Edward Southern en 1975, de ahí su nombre. Se basa en la transferencia por capilaridad de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restric-

ción, separados por electroforesis en gel de agarosa. La corrida electroforética permite separar los múltiples fragmentos obtenidos de acuerdo con su peso molecular. Los más ligeros migran o se separan más del origen donde se aplicó la muestra, mientras que los más pesados quedan más cercanos al origen. Luego se procede a la separación de la doble hélice mediante la desnaturalización alcalina. Estas cadenas simples de ADN se transfieren por capilaridad, tal como ocurre con la tinta en un papel secante (de ahí la palabra blotting o mancha), a un soporte sólido que puede ser un filtro de nylon o de nitrocelulosa. Posteriormente, el filtro se hibrida con una sonda marcada radioactivamente, específica del fragmento de ADN que queremos analizar y, después de lavar para eliminar el exceso de sonda que no ha hibridado con los fragmentos de interés, se exponen a una placa fotográfica en un cassette con pantalla amplificadora y se someten a 70°C centígrados durante 48 a 72 horas, lo que permite visualizar los fragmentos de interés al revelar la placa (Figura 12.4).

Northern Blotting y Western Blotting

Luego del Southern Blotting se describieron las técnicas para el estudio molecular del ARN y de las proteínas. Como analogía en su denominación con la primera (Southern en

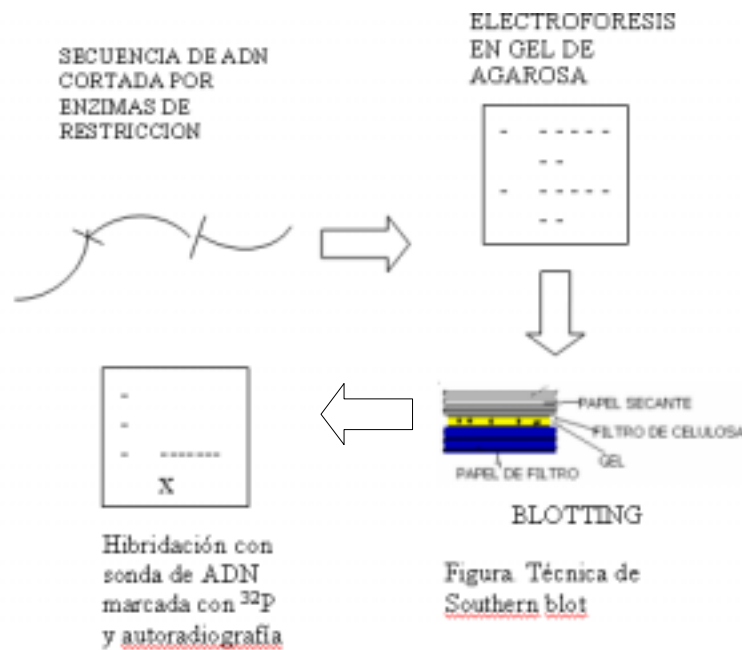


Figura. 12.4. Esquema que representa el procedimiento de transferencia de ADN (Southern blotting). Los detalles se explican en el texto.

Inglés significa en el sur) se prefirió denominarlas Northern blotting y Western blotting (que en inglés significan en el norte y en el oeste, respectivamente).

El Northern blotting es el estudio de ARNm mediante electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes. La transferencia del ARN a un filtro de nylon se realiza del mismo modo que en el método de Southern, aunque en este caso no es necesario realizar el tratamiento de desnaturalización con hidróxido sódico, pues el ARN es un ácido nucleico de hebra simple. El ARN transferido al filtro de nylon se hibrida del mismo modo que el ADN. Este método, denominado Northern blotting, permite confirmar la presencia de un ARN determinado en un tejido, conocer el tamaño del transcripto y apreciar el nivel de expresión de un gen, a la vez que observar fragmentos de ARN inmaduros. En ciertas ocasiones es posible observar la presencia de varios ARNm para un mismo gen, los cuales pueden aparecer debido al uso de lugares de empalme alternativo, a la existencia de lugares de poliadenilación distintos, al empleo de varios promotores o a otros mecanismos.

Por medio del Western blotting se puede obtener información sobre el tamaño de la molécula proteínica, así como de la cantidad de la proteína sintetizada. Ello se logra mediante el aislamiento de la proteína extraída de las células, separada, según la masa molecular, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y luego transferida a una membrana que se incuba con anticuerpos que reconocen específicamente la proteína de interés la cual puede ser el producto de un gen mutado. La reacción antígeno anticuerpo puede ser detectada por un segundo anticuerpo dirigido contra el primero y que presenta una marca que permite localizarlo, con el empleo de métodos histoquímicos, fluorescentes o por radiaciones. Un ejemplo de uso de esta técnica es su aplicación para detectar la distrofina en los pacientes con distrofias musculares ligadas al X.

ESTUDIOS DE MARCADORES MOLECULARES POR LIGAMIENTO

Existen varios procedimientos para el estudio indirecto del gen mutado. Todos ellos se basan en la asociación (ligamiento) entre secuencias del ADN que no siempre pertenecen al gen buscado y éste. La lógica del pensamiento es la siguiente, si el gen mutado está generalmente acompañado de una secuencia determinada fuera de él, la presencia de esta secuencia es un indicador indirecto de la presencia del gen mutado. El uso de estos procedimientos serán estudiados en el capítulo 13. Aquí solamente haremos una breve referencia a uno de ellos.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

Este procedimiento consiste en extraer el ADN y fragmentarlo mediante el uso de enzimas de restricción. Como resultado se obtiene un grupo numeroso de fragmentos de

ADN de diferente longitud que pueden ser separados por electroforesis en un soporte adecuado (agarosa, poliacrilamida, etc.).

Una mutación puede tener como resultado que se borre uno de los sitios de restricción para esa enzima, o por el contrario que aparezca un nuevo sitio de restricción. En ambos casos aparecen nuevos fragmentos de longitud diferente que pueden ser detectados por comparación con los resultados habituales.

Si un alelo específico está asociado (ligado) con uno de esos fragmentos, entonces se puede inferir la presencia del alelo al identificar ese fragmento. Por lo tanto se trata de un método indirecto pues lo que se identifica directamente no es el alelo buscado sino el fragmento que habitualmente está asociado con él (Figura 12.5).

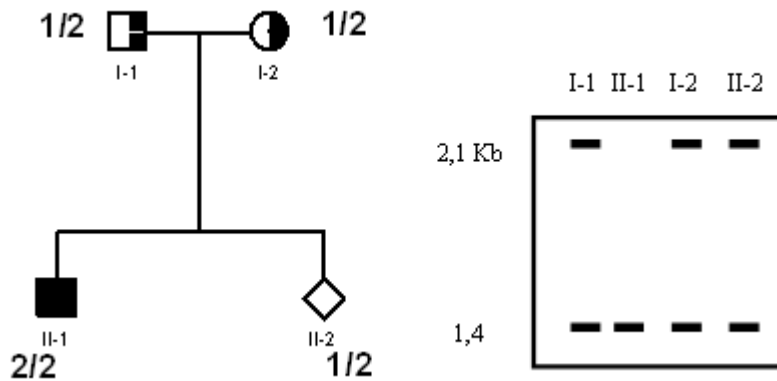


Figura 12.5. Familia donde II-1 está afectado con fibrosis quística. El gen para la fibrosis quística segrega junto con el alelo 2 del RFLP. Como II-1 es homocigótico para el alelo 2 también lo será para el gen de la fibrosis quística y por lo tanto será enfermo.

SECUENCIACIÓN DE ADN

El proceso de secuenciación consiste en determinar el orden de los desoxinucleótidos en la molécula del ADN. El ADN que se va a secuenciar (ADN molde) puede estar introducido en un vector, o bien puede proceder de una amplificación por el método de la PCR, y debe estar desnaturizado. El método consiste en lo siguiente: El ADN desnaturizado se incuba con una ADN polimerasa, los cuatro desoxinucleótidos y un didesoxinucleótido, es decir, que carece de OH en la posición 3'. A esta mezcla se añade un oligonucleótido que es complementario al extremo 5' del ADN molde, que es el cebador. El cebador se une al extremo 5' por complementariedad de bases y proporciona el iniciador necesario para la acción de la ADN polimerasa. Cuando la enzima incorpora un

didoxinucleótido la polimerización se interrumpe, pues como este nucleótido carece del OH de la posición 3' no puede unirse con el siguiente.

En los métodos clásicos, no automatizados, para la detección se utilizan cuatro mezclas de reacción y en cada una de ellas se coloca un desoxirribonucleótido marcado radiactivamente. Con este procedimiento se obtiene un grupo de cadenas de distintos tamaños, cada una de las cuales finaliza en el didoxinucleótido marcado añadido a la mezcla. Los fragmentos obtenidos se separan según su tamaño por electroforesis en gel de poliacrilamida capaz de separar segmentos que difieran en un solo nucleótido y se visualizan mediante autorradiografía. La lectura de los tamaños de los fragmentos obtenidos con cada didoxirribonucleótido se corresponde con la secuencia complementaria del ADN molde.

En la actualidad existen equipos (secuenciadores o autoanalizadores de ADN) que realizan la lectura de los geles de forma automática. En un refinamiento de la técnica se emplean marcadores fluorescentes de cuatro fluorescencias distintas, obteniendo la secuencia de forma mucho más rápida, a la vez que analiza simultáneamente varias secuencias. El perfeccionamiento de la técnica de secuenciación automática del ADN está permitiendo un avance considerable en el estudio del genoma humano.

RESUMEN

1. Las herramientas que se utilizan en Genética molecular incluyen, entre otras, las enzimas de restricción y ligasas, las sondas, los vectores y los hospederos.
2. Para obtener copias suficientes de ADN puede utilizarse las técnicas de clonación in vitro o in vivo (Reacción en cadena de la Polimerasa).
3. La clonación in vivo incluye la producción de fragmentos de ADN con el uso de endonucleasas de restricción, la incorporación de éste a un vector adecuado (plásmido, fago o YAC), la introducción de dicho vector en un hospedero y la posterior selección de clones que contengan una secuencia específica.
4. Mediante métodos de estudio molecular se pueden estudiar ADN, proteínas y ARN. Los estudios de ADN pueden ser directos (PCR, Southern blotting y la secuenciación) o indirectos (RFLP). Los métodos para estudiar ARN y proteínas se denominan: Northern blotting y Western blotting, respectivamente.