

Area de Beca: CM - Cs. Médicas

Título del Trabajo: DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN DF508 CAUSANTE DE FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE PCR REAL TIME

Autores: MARTINEZ, SILVINA M - ORTOWSKY, CINTHIA C - SOTO, SUSANA

E-mail de Contacto: silvinammartinez@yahoo.com

Teléfono:

Tipo de Beca: UNNE Iniciación Tipo A **Resolución N°:** 975/13 C.S **Período:** 01/03/2014 - 01/03/2017

Proyecto Acreditado: Proy PFIP-convocatoria 2009. Disposición 002/11 COFECyT. "DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICA ALTERNATIVA PARA DETECCIÓN DE FIBROSIS QUÍSTICA EN PACIENTES ENFERMOS Y PORTADORES". Finaliza marzo 2016.

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura

Palabras Claves: ADN, gen CFTR

Resumen:

INTRODUCCIÓN: La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades genéticas mortales más frecuentes en la raza caucásica. Afecta a múltiples órganos y sistemas, especialmente el aparato respiratorio, el páncreas, las glándulas sudoríparas y el sistema reproductor masculino. Si bien esta enfermedad genética es causada por más de 1000 mutaciones del gen regulador de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), existe una mutación mayoritaria, la delección de tres pares de bases que codifican un único aminoácido (fenilalanina) en posición 508 (mutación DF508).

Hasta el presente, en nuestra región, la detección de mutaciones del gen CFTR se realiza mediante PCR seguida de corrida electroforética en gel agarosa y tinción con bromuro de etidio (SSP-PCR); técnica puesta a punto en nuestro laboratorio. Además, nuestro grupo de trabajo implementó el uso de una técnica de PCR utilizando primers genéricos seguida de corrida electroforética en PAGE y tinción con Gel Red (no cancerígeno).

MATERIALES Y METODOS:

Muestras: se trabajó con 10 muestras: 3 homocigotas para la mutación DF508 (enfermos), 3 heterocigotas para la mutación DF508 (portadores), y 4 normales (sanos); ya identificados por método convencional de PCR acompañado de detección de amplicones por electroforesis en gel de agarosa (PCR-SSP).

Procedimiento: Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre entera anticoagulada con EDTA utilizando el método con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio). Se realizó el control de la calidad y cantidad del ADN extraído mediante corrida en gel de agarosa. Se amplificó mediante un equipo CFX 96 Real time System de BioRad ensayándose dos reacciones para cada una de las muestras: una reacción con el par de primers que amplifica la región que no contiene la mutación (WT/CD16) y otra reacción con el par de primers que amplifica la región que contiene la mutación DF508 (DF508/CD16).

Se utilizó una master mix KAPA SYBR Fast Q-PCR Universal Biosystem (2X), la cual tiene Syber (sustancia fluorescente que se intercala a la doble hebra de ADN), dNTPs, tampón de reacción y ADN polimerasa. A esta mezcla se le adiciona los cebadores específicos y el ADN de las muestras. Todas las muestras se procesaron por duplicado, empleando en cada caso controles negativos de reacción (NTC: no template control).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

En las reacciones utilizando el par de primers (WT/CD16) se observa que el valor de Ct (la concentración en el punto threshold) es de 27 para el control sano y de 28 para el paciente heterocigota. Mientras que no se observa amplificación para el caso del homocigota. En las reacciones utilizando el par de primers (DF508/CD16) se observa que el valor de Ct (la concentración en el punto threshold) es de 22 para el homocigota y de 24 para el paciente heterocigota. Mientras que no se observa amplificación para el caso del control sano. Los resultados obtenidos presentan alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad al comparar con el método de PCR simple.

La técnica de Real Time representa una alternativa eficiente, confiable que permite detectar una de las mutaciones más frecuentes asociadas a la fibrosis quística, obteniéndose resultados en corto tiempo y con un costo razonable.

Además la técnica permite la posibilidad de aumentar la especificidad de la reacción por medio del agregado de sondas específicas a la mezcla de reacción.