



XXII Comunicaciones Cientificas y Tecnologicas

Orden Poster: CM-052 (ID: 525)

Autor: Martinez, Silvina Maria

Título: DIFERENCIA EN LA CAPACIDAD DE HIBRIDACIÓN DE AMPLIFICADOS DEL GEN CFTR

Director:

Palabras clave: ADN,gen CFTR,fibrosis quística,hibridación

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Iniciacion Tipo A

Periodo: 01/03/2014 al 01/03/2017

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Exactas Y Naturales Y Agrimensura

Proyecto: (PFIP 2009) Diseño e implementación de tecnica alternativa para detección de fibrosis quística en pacientes enfermos y portadores

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 Gel red. En búsqueda de alternativas diagnosticas se está desarrollando una técnica basada en hibridación con sondas, de la cual surge el presente trabajo consistente en la siembra de amplificadores de diferentes tamaños de regiones del gen CFTR y su posterior detección con sondas específicas marcadas.

-MATERIALES Y MÉTODOS: Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre entera anticoagulada con EDTA de individuos sanos (no portadores de mutaciones causantes de fibrosis quística), previo consentimiento informado, utilizando el método con CTAB. Se amplificó el ADN extraído mediante pcr utilizando los primers obtenidos analizando la secuencia del gen normal y mutado CFTR del banco de datos de mutaciones del gen de Fibrosis Quística. El primer par de primers permite amplificar una región de 138 pb del gen CFTR (gen normal) ó de 135 pb para el gen mutado (DF508). El segundo par de primers permite amplificar una región de 713 pb del gen CFTR (gen normal) ó de 710 pb para el gen mutado (DF508). Se sembraron en punto los amplicones obtenidos en membranas de nylon. Luego se llevó a cabo el proceso de hibridación enfrentando los amplicones sembrados a una sonda específica biotinilada a 58°C. Se lavaron las membranas y se detectó la sonda con estreptavidina conjugada con HRP. El revelado de la sonda se realizó con solución de Luminol y peróxido en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego las membranas fueron expuestas directamente a un film RX. Se reveló el film de RX pasando sucesivamente por soluciones de revelado, lavado y fijado y se dejó secar.

-RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Los amplicones de 138 y 713 pares de bases correspondientes al gen CFTR, resultantes de las PCR ensayadas, se corrieron en gel de agarosa al 1,5% con tinción de Gel red. Con estos se llevó a cabo la hibridación con la sonda específica. El amplicón de 713 pb dió un resultado positivo (aparición de botón negro en placa radiográfica). Al enfrentar la misma sonda al amplicón de 138 pb no se obtuvo hibridación, es decir, el resultado fue negativo (ausencia de botón negro en placa radiográfica). Estos ensayos de hibridación con ADN de individuos sanos, no portadores de gen mutado, evidencian la mayor capacidad de hibridación de la sonda con un amplicón de gran tamaño y permitiría aplicar los ensayos a muestras de ADN homocigotas (individuos enfermos) y heterocigotas (individuos portadores) para mutaciones causantes de fibrosis quística. En conclusión, los resultados obtenidos brindan información necesaria para continuar con el desarrollo de la técnica.