



XXIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CM-043 (ID: 1027)

Autor: Martinez, Silvina Maria

Título: DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN DF508 POR HIBRIDACIÓN CON SONDA ESPECIFICA

Director:

Palabras clave: gen CFTR, Fibrosis quística, DF508, Hibridación

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Iniciación 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 técnica alternativa para detección de fibrosis quística en pacientes enfermos y portadores

Resumen:

INTRODUCCIÓN: La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética que afecta a múltiples órganos y sistemas, especialmente el aparato respiratorio, el páncreas, las glándulas sudoríparas y el sistema reproductor masculino. Si bien 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 busca de alternativas diagnósticas está en desarrollo una técnica basada en la detección de mutaciones por hibridación con sondas específicas marcadas, lo cual da origen al presente trabajo cuyo objetivo fue detectar la mutación DF508 por esta metodología.

-MATERIALES Y MÉTODOS: Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre entera anticoagulada con EDTA de individuos no portadores de mutación (sanos), individuos homocigotas para la mutación DF508 (enfermos) e individuos heterocigotas para la mutación DF508 (portadores), todas previamente identificadas por método convencional. 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, obteniéndose amplicones de 713 pb del gen CFTR (gen normal) y de 710 pb para el gen mutado (DF508). Se sembraron los amplicones en punto en membranas de nylon. Luego se llevó a cabo el proceso de hibridación enfrentando los amplicones sembrados a una sonda específica para gen CFTR normal y una sonda específica para la mutación DF508, biotiniladas, a 58°C. Se lavaron las membranas y se detectaron las sondas con estreptavidina conjugada con HRP. El revelado de las sondas 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 Y DISCUSIÓN: Los amplicones de 710 y 713 pares de bases correspondientes al gen CFTR se corrieron en gel de agarosa al 1,5% con tinción de Gel red. La sonda Normal hibridó solo con ADN de individuos sanos y portadores de la mutación DF508 (heterocigotas) (aparición de botón negro en placa radiográfica), mientras que la sonda Mutada hibridó con ADN de individuos enfermos (homocigotas) y portadores de DF508 (heterocigotas).

El éxito de estos ensayos de hibridación del ADN con sondas específicas evidencia la sensibilidad y especificidad de esta técnica alternativa cuyo fin último, en etapas posteriores, es poder detectar varias mutaciones en simultáneo (a través de una PCR multiplex). Se disminuiría así el gasto en reactivos, por realizarse un solo ensayo de PCR, considerando que se reduce el consumo de taq polimerasa, principal determinante del costo del ensayo.