

# EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA ARMS-PCR PARA EL ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS

ESNARRIAGA, María S.<sup>a,\*</sup>; MASCHERONI, María B.<sup>b</sup>; ACOSTA, Karina B.<sup>a,c</sup>

a) Laboratorio de Biotecnología Molecular. Instituto de Biotecnología Misiones. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

b) PREDIGMA - Centro de Medicina Preventiva

c) CONICET

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) en la provincia de Misiones constituye una importante causa de morbimortalidad, en los últimos 10 años se ha evidenciado un incremento gradual en la incidencia del CM en mujeres jóvenes. Muchos estudios han mostrado un alto número de pacientes jóvenes resultan negativas para los paneles genéticos convencionales, sugiriendo que existen otros genes adicionales implicados en el inicio temprano de CM. Sin embargo, en comparación con las pacientes postmenopáusicas, los datos genéticos y genómicos para este grupo de pacientes, son escasos. Por lo que, el estudio de variantes en genes candidatos asociados a la patología, constituyen un importante aporte a la genética epidemiológica local y global. El objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica de ARMS-PCR, para la determinación de las variantes genéticas g.4822A>G y g.4777C>A en los promotores de los genes *BAX* y *BCL2*, respectivamente; en muestras de ADN extraídas de pacientes jóvenes con CM (con edad menor a 50 años).

## METODOLOGÍA

**Muestras analizadas:** se utilizaron controles positivos, muestras de ADN previamente genotipificadas por secuenciación.

**Diseño de cebadores:** Se diseñaron cebadores específicos que permiten discriminar los alelos variantes de los alelos *wild type* mediante la herramienta bioinformática Primer-BLAST

**Tabla 1:** Cebadores diseñados y fragmentos correspondientes.

	Cebadores Forward	Cebadores Reverse	Fragmento
g.4822A>G <i>BAX</i>	F- TTAGAGACAAGCCTGGGCGT	R(G)- TGGCGCCGTCCAACAGCGGT R(A)- TGGCGCCGTCCAACAGCGGT	250pb
g.4777C>A <i>BCL2</i>	F(C)- CCGGCTCCTTCATCGTGCCC F(A)- CCGGCTCCTTCATCGTGCCA	R-GGCGGCAGATGAATTACAA	180pb

Se verificó la amplificación en electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed™, a 120V por 30 minutos con buffer TBE 0,5X.

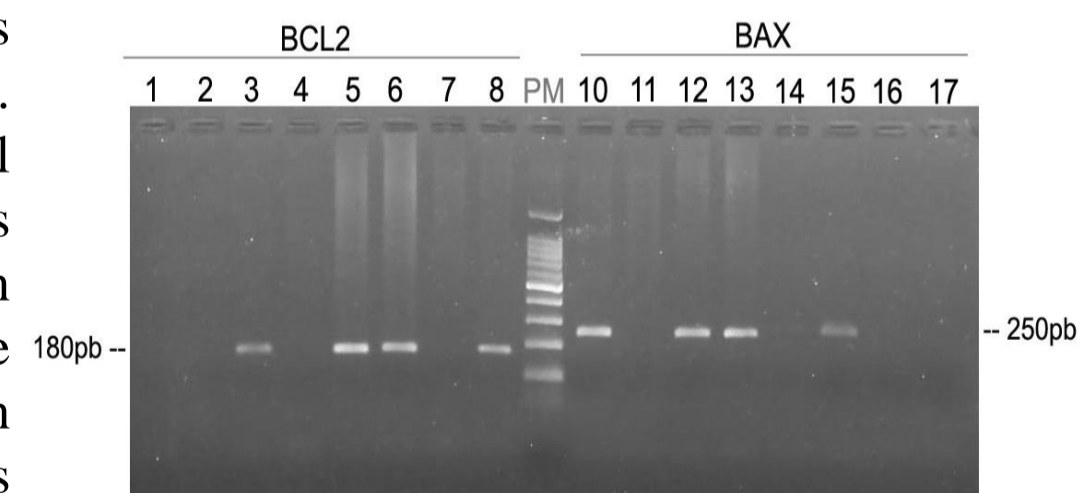
**PCR:** se realizaron reacciones en un volumen final de 20 µl, conteniendo 1µl de ADN muestra, Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, dNTPs 100µM, cebadores alelo específicos 5pmoles y Taq polimerasa 0,5U.

**Ciclado:** una etapa inicial de 3min a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C, se probaron diferentes temperaturas de hibridación entre 60 - 65°C y una etapa de extensión a 72°C, cada etapa con una duración de 40 segundos, concluyendo el ciclado con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

## RESULTADOS

La técnica de ARMS-PCR resultó ser eficiente para discriminación alélica de las variantes en los promotores de los genes *BAX* a temperatura de 65° C y *BCL2* a 62°C, permitiendo la identificación de los tres genotipos posibles para ambos genes.

**Figura 1:** Amplificación de los fragmentos de *BAX* y *BCL2*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1y 2: controles negativos. Carril 3 – 8: amplicón de 180pb. Peso molecular de 100pb. Carriles 10-15: amplicón de 250pb. Carril 16-17: controles negativo.



## CONCLUSIONES

La implementación de esta técnica es adecuada para el estudio de variantes genéticas en *BAX* y *BCL2*. Con los resultados presentados en este trabajo, se procederá a la genotipificación de muestras clínicas correspondiente a mujeres jóvenes diagnosticadas con CM. Los datos genéticos obtenidos permitirán una mejor comprensión de los procesos moleculares implicados en la carcinogénesis temprana.