

ESTUDIO MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS P Y T CONSTITUYENTES DEL SISTEMA DE CLIVAJE DE LAGLICINA EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE HIPERGLICINEMIA NO CETÓSICA (HNC)

PINILLA, G.¹, BERMÚDEZ, M., NAVARRETE, J., ALMONACID, C.^{1,2}, SÁNCHEZ, R.¹, ARTEAGA, C.³, CIFUENTES, Y.^{2,3}

¹Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

²Instituto Materno Infantil. ³Universidad Nacional de Colombia, Bogota. rudie1@yahoo.com

OBJETIVOS

Analizar por medio de métodos moleculares el defecto enzimático en las proteínas P y T constituyentes del complejo enzimático del clivaje de la glicina.

Establecer estrategias de biología molecular que permitan identificar la mutación que afecta las proteínas P y T

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN: Muestras de cordón umbilical de neonatos sanos (control negativo). Pacientes con diagnóstico presuntivo de HNC y sus familiares identificados en Colombia.

ESTUDIOS MOLECULARES: Utilizando muestras de sangre de pacientes y muestras de control se obtuvo DNA por varios métodos dependiendo del tipo de muestras a analizar (filtros o sangre directa). Amplificación por PCR empleando primers previamente seleccionados para detectar las mutaciones S564I y H42R en las proteínas P y T respectivamente.

RESULTADOS

Se seleccionó como método de extracción de ADN, Ready/Amp y Salting Out para muestras secas (filtro) y líquidas (anticoaguladas), que ofrecieron mayor facilidad durante la manipulación y garantías de calidad.

Para el análisis mutacional de las 2 secuencias en estudio, se obtuvo para la proteína P un fragmento de 230pb y otro de 51 pb específicos para el sitio de la mutación S564I, se establecieron las condiciones óptimas, en cuanto a reactivos limitantes, ciclos, temperaturas y tiempos. Si bien los 2 productos de 230 y 51 pb se obtuvieron, es necesario confirmar mediante cortes enzimáticos y secuenciación, si la mutación S564I se encuentra en los pacientes en estudio, o si se trata de una mutación también presente en la región amplificada y reconocida por los primeros empleados.

Para la estandarización de la PCR, empleando los primers T1- T2, se probaron diferentes condiciones que permitieron la obtención de un producto de 263pb, aunque la mutación no se ha confirmado mediante enzima de restricción.

Para lograr identificar las mutaciones en estudio, se proyecta tanto los análisis con enzimas de restricción como el Análisis de Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla. De igual manera la confirmación del diagnóstico de HNC implica la cuantificación del sistema de clivaje de glicina, el cual se va a realizar en linfocito transformados con el virus de Epstein Bar.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos fragmentos de 230pb y 51 pb correspondientes al sitio donde se encuentra la mutación de la proteína P. Se obtuvo un fragmento de 263 pb correspondiente al sitio donde se encuentra la mutación de la proteína T.