

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE GENOMAS DE INSECTOS Y LA EVOLUCIÓN DE LOS ELEMENTOS REGULATORIOS

Barbero A<sup>1</sup>, N Riva<sup>1</sup>, A Gorga<sup>1</sup>, C Molina<sup>1</sup>, E Gazza<sup>1</sup>, L Farace<sup>1</sup>, M Estermann<sup>1</sup>, N Pretini<sup>1</sup>, A Nazar<sup>1</sup>, D Vitale<sup>1</sup>, D Acosta<sup>1</sup>, N Bonadeo<sup>1</sup>, P Cerchi<sup>1</sup>, S Palma<sup>1</sup>, R Rivera Pomar<sup>1,2</sup>, A Lavore<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Universidad del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), <sup>2</sup>Centro de Bio-Investigaciones (UNNOBA).

e-mail: vitaledai@gmail.com

Uno de los grandes desafíos en la interpretación de los genomas es entender la codificación temporal y espacial de la información de la expresión génica. Uno de los primeros pasos para estudiar estos procesos es identificar regiones regulatorias. En eucariotas, esta información se organiza de forma modular en *enhancers*, donde se encuentran agrupados los sitios de reconocimiento de múltiples factores de transcripción. El organismo mejor conocido con demostración experimental de los *enhancers* es *D. Melanogaster*. A partir de la información genómica disponible de cuatro especies de insectos, *D. melanogaster*, *Tribolium castaneum*, *Oncopeltus fasciatus* y *Rhodnius prolixus*, se definieron como modelos genes involucrados en la segmentación embrionaria de los que se posee información experimental a partir de estudios en *D. melanogaster* (Krüppel, giant, hunchbach, knirps, tailless, engrailed y even skipped). Los genes fueron identificados por BLAST en los genomas disponibles y en las secuencias *upstream* al origen de transcripción fueron definidas las potenciales regiones regulatorias. El análisis se llevó a cabo usando el Software PATSER para la búsqueda de los sitios de unión para factores de transcripción y el software STUBB para el análisis de *clustering*. Esto permitió identificar potenciales regiones regulatorias para cada uno de los genes, observando que en algunos casos estos dominios se encuentran conservados tanto en la posición relativa al inicio de la transcripción como en el entramado de sitios de unión para factores de transcripción en las diferentes especies analizadas.

## DETECCIÓN DE AFRICANIZACIÓN EN *Apis mellifera* EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Genchi García ML<sup>1</sup>, G Barbisán<sup>1</sup>, AR Guardia López<sup>2</sup>, M Bacci<sup>3</sup>, CD Golijow<sup>1</sup>, FJ Reynaldi<sup>4,5</sup>. <sup>1</sup>IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria) FCV UNLP- CONICET, <sup>2</sup>Laboratorio Central de Sanidad Apícola Ministerio de Asuntos Agrarios Peia de Buenos Aires, <sup>3</sup>Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), <sup>4</sup>Cátedra de Virología. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP, <sup>5</sup>CCT-CONICET La Plata.

e-mail: ml.genchigarca@gmail.com

En el marco del proyecto “Dinámicas territoriales y formulación de lineamientos estratégicos para la inversión en Infraestructura: Zonificación y Promoción del sector Apícola en la Provincia de Buenos Aires” (Consejo Federal de Inversiones y Ministerio de Asuntos Agrarios BsAs, 2013–2014) se propuso llevar a cabo el estudio a nivel genético de muestras de abejas a partir de la aplicación de métodos basados en la variabilidad genética de las poblaciones. El objetivo fue detectar la presencia de introgresión de genes africanos en colonias de *Apis mellifera* provenientes de colmenares situados en la provincia de Buenos Aires. Las muestras se analizaron a partir del estudio de la región del DNA mitocondrial perteneciente al citocromo b por técnicas de PCR-RFLP. En total se procesaron 430 muestras. En todos los casos se extrajo el DNA de cada muestra con DNazol y se amplificó por PCR. Luego se realizó un corte en la secuencia amplificada con la enzima de restricción BglII. Esta enzima permitió diferenciar los haplotipos africanizados de los no africanizados a partir de la distinción de un patrón de bandas observado en un gel de electroforesis. Sólo se detectó africanización en el 4% de los casos, mientras que el resto de las muestras no han exhibido genotipos africanizados. Estos resultados permitieron detectar colmenares con abejas que presentaron introgresión de genes africanos, estos colmenares serán sujetos a un plan de contingencia con el fin de eliminar y/o controlar la dispersión de estos genotipos en la Provincia de Buenos Aires.

## FACING *Polybia paulista* (HYMENOPTERA; VESPIDAE) VENOM ALLERGY: FROM NATURAL TO RECOMBINANT ALLERGENS

Pérez-Riverol A<sup>1</sup>, DL Justo Jacomini<sup>1</sup>, SM Gomes Moreira<sup>2</sup>, RL Zollner<sup>3</sup>, I Ferrero Ratti<sup>4</sup>, FD Campos Pereira<sup>5</sup>, MR Brochetto Braga<sup>6</sup>.  
<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodos. Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. <sup>2</sup>Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Candelária, Natal, RN, Brazil. <sup>3</sup>Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental-LIAE, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, SP, Brazil. <sup>4</sup>Universidad Nacional del Litoral (UNL) Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB). Santa Fe, Argentina. <sup>5</sup>Laboratório de Mutagêneses Ambiental. Instituto de Biociências. UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. <sup>6</sup>Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos-CEVAP, UNESP. Botucatu, SP, Brazil.  
 e-mail: aperezriverol@gmail.com

*Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) is a one of most abundant social wasp on Sao Paulo, Brazil. Accidents by stings are common and cause immunologic reactions that in allergic patients can lead to dead. To date, there are no commercial allergenic extracts or components available in Brazil to diagnosis and treatment venom allergy from social wasp, despite of the great number of existing species. Specific immunotherapy (SIT) and diagnostic has been made by using crude and commercial venom extracts or purified natural allergens from species of Northern Hemisphere. These are inadequate practices since they are related to the occurrence of cross reactivity that in many cases prevent the proper identification of the specie that causes the allergy. In the other hand, thousands of insects along with a highly expensive and complicated process of purification are required to obtain standardized natural allergens from social hymenoptera venom. Recombinant allergens have proved to be an interesting alternative to achieved STI and to diagnosis of allergy caused not only for by Hymenoptera insects but also, other kinds of allergens. In this work we described the methodology currently used in our lab to obtain the recombinant forms of the major allergens from *Polybia paulista* venom. The recombinant allergens have proved to recognize IgE from allergic patients and also to be useful for the specific diagnostic of allergy to *Polybia paulista* venom. These results come to contribute to the improvement of methodologies for STI and diagnostic of Hymenoptera venom allergy used in Brazil.

## GLI2 EN EL DESARROLLO DE LA CRESTA NEURAL DEL EMBRIÓN DE *Xenopus laevis*

Palacio MB<sup>1</sup>, S Cerrizuela<sup>1</sup>, MJ Aybar<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>INSIBIO (CONICET-UNT), San Miguel de Tucumán, Argentina, <sup>2</sup>Instituto de Biología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.  
 e-mail: mjaybar@fbqf.unt.edu.ar, e-mail: palaciomb@hotmail.com

La cresta neural (CN) es una población celular multipotente y migratoria exclusiva de los vertebrados. Estas células dan lugar a una gran variedad de tipos celulares como cartílago, hueso, células endócrinas, melanocitos y neuronas, entre otros. Este potencial de diferenciación y la capacidad de autorenovación, dan a estas células características de células troncales. La vía de señalización Indian Hedgehog tiene un rol clave en la formación, migración y mantenimiento de la cresta neural en *Xenopus*. En nuestro laboratorio se estableció el patrón de expresión del gen *gli2*, en la cresta neural prospectiva. En el presente trabajo, con el objeto de analizar la función de este gen, se diseñó y construyó un vector de expresión conformado por el promotor del gen *snail2* ( $\alpha 3000$ ), un gen expresado en la CN, para dirigir la expresión del gen *gli2*. La sobreexpresión de  $\alpha 3000$ -*gli2* disminuye el territorio de cresta neural. Cuando el constructo fue co-inyectado con un oligonucleótido tipo morfolino, específico para *gli2* que bloquea su expresión endógena,  $\alpha 3000$ -*gli2* fue capaz de restaurar la inducción de la cresta neural, indicando que este gen resulta esencial para la inducción de la CN. Se realizaron además experimentos para evaluar la relación epistática entre los genes *gli2* y *gli3*. Los resultados mostraron que  $\alpha 3000$ -*gli2* permite el control espacio-temporal de la sobreexpresión directamente en el territorio de la CN a partir del momento que las señales inductoras activan al promotor, y destacan la importancia del gen *gli2* en la inducción y especificación inicial del territorio de CN.

## CARACTERIZACIÓN DEL GEN WDR68 EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Xenopus laevis*

Bonano M<sup>1,3</sup>, E Martín<sup>1,2</sup>, MM Moreno Ruiz Holgado<sup>1,2</sup>, G Ruiz de Bigliardo<sup>1,2</sup>, MJ Aybar<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Ciencias Naturales e IML- Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, Tucumán, Argentina, <sup>2</sup>Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251, Tucumán, Argentina, <sup>3</sup>Instituto de Biología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia - Universidad Nacional de Tucumán. Chacabuco 461, Tucumán, Argentina.  
e-mail: mbonano@fbqf.unt.edu.ar

El estudio de los genes que se activan durante los estadios embrionarios contribuye al conocimiento de los procesos moleculares que guían las primeras etapas del desarrollo. *Xenopus laevis* es un organismo modelo que ofrece importantes ventajas para dilucidar las vías de señalización involucradas en procesos del desarrollo. El gen *wdr68* aparece como relevante por la presencia de homólogos en numerosos taxones eucariotas. Codifica una proteína que lleva a cabo funciones diversas como producción de antocianina en vegetales y regulación del desarrollo craneofacial en pez cebra. En este trabajo identificamos una secuencia de ADNc de *wdr68* en *X. laevis*. Estudios bioinformáticos demuestran que la secuencia aminoacídica codificada por este gen presenta una alta homología con las correspondientes en otros vertebrados. La sintenia señala que en la evolución se ha conservado la región cromosómica conteniendo al locus *wdr68* y a sus genes flanqueantes. Por técnicas de RT-PCR e hibridación in situ, definimos el patrón de expresión temporal y espacial de *wdr68* en este anfibio. Este gen se detecta desde las etapas más tempranas, primeramente con una localización ubicua, restringiéndose luego al ectodermo dorsal. A medida que avanza la neurulación, *wdr68* se expresa en la cresta neural migratoria y más tarde en el extremo cefálico y los arcos branquiales. Cabe destacar que gran parte de la cabeza de los vertebrados deriva de cresta neural, por ello identificar los genes que guían su desarrollo es crucial para comprender los procesos patológicos que implican a esta población celular.

## ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE POBLACIONES DE *Ancistrus sp.* (LORICARIIDAE) DE LA CUENCA DEL RIO PARAGUAY

Borba RS<sup>1</sup>, S Mariotto<sup>2</sup>, L Centofante<sup>3</sup>, D Ferreira<sup>4</sup>, CH Zawadzki<sup>5</sup>, PP Parise-Maltempi<sup>6</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, SP, Brasil, <sup>2</sup>Instituto Federal de Ciências e Tecnologia do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil, <sup>3</sup>Instituto de Biociências, UFMT Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil, <sup>4</sup>Instituto de Biociências, UFMT Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil, <sup>5</sup>Departamento de Biología, NUPELIA, UEM, Maringá, PR, <sup>6</sup>Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, SP, Brasil.  
e-mail: rafasborba@hotmail.com

Datos citogenéticos han ayudado a discriminar y aislar algunas poblaciones de *Ancistrus* de la cuenca del río Paraguay, pero las relaciones entre las especies del género en esta región permanecen oscuras. El presente trabajo apunta a establecer relaciones filogenéticas y estimar las distancias genéticas, utilizando secuencias de DNA mitocondrial, entre nueve poblaciones de *Ancistrus sp.* de la cuenca del río Paraguay y comparar los resultados con los datos citogenéticos existentes. Fueron analizadas secuencias del gen ATPase (6/8) de 32 individuos, la alineación fue conducida en el programa BioEdit y el análisis filogenético y la distancia genética se llevaron a cabo en el programa MEGA 5.0. El secuenciamiento generó 896pb con 626pb conservados y 270pb variables. La topología generada mostró una subdivisión con nueve clados (A-I), los cuales mostraron el aislamiento de las poblaciones que vinculan claramente la ciudad para el número diploide de los individuos. La distancia p dentro de los clados presentó valores inferiores a 1%, lo que indica que cada uno de los clados comprende una sola especie de *Ancistrus*, mientras que el porcentaje de las distancias observadas entre los siete grupos mostraron valores generalmente mayores que 7%. Nuestros resultados muestran que los caracteres del genoma mitocondrial son buenos marcadores para distinguir y aislar las poblaciones analizadas a nivel de especies y corroboran los datos cromosómicos observados anteriormente, donde el número diploide y algunas características del cariotipo actúan como marcadores para las poblaciones analizadas.

## rRNA 16S PARA DISCRIMINAR ESPECIES DE HAEMULIDAE (PERCIFORMES) DEL ATLÁNTICO OCCIDENTAL

Gomes G<sup>1</sup>, R Silva<sup>1</sup>, I Veneza<sup>1</sup>, H Schneider<sup>1</sup>, I Sampaio<sup>1</sup>, G Gomes<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Aplicada. Instituto de Estudios Costeros. Universidad Federal del Pará - Bragança - Pará Brasil.  
 e-mail: gabriellegomes@outlook.com.br

La familia Haemulidae tiene una alta diversidad y es distribuida en el Atlántico, Índico y Pacífico. Comprende alrededor de 147 especies, 17 géneros y 2 subfamilias. En Brasil hay cerca de 25 especies, algunas con gran importancia económica en el país, observadas en las estadísticas de la pesca extractiva marina. A pesar de su relevancia en los escenarios bioecológico y la pesca, se han realizado pocos estudios sobre genética forense y protocolos de autenticación molecular. Por lo tanto, este estudio examinó la eficacia de la gen mitocondrial 16S rRNA de discriminar especies del grupo. Recopilamos 17 muestras sin identificación de Haemulidae a lo largo de la costa del Brasil y obtuvo un fragmento de 536 pb del gen 16S. Fue generado árbol de Agrupación de Vecinos con Lutjanidae y Sciaenidae como grupo externo y secuencias de Haemulidae del *GenBank* (*Conodon nobilis*, *Haemulon plumieri* y *H. parra*) para ayudar a identificar las muestras. El árbol mostró con gran apoyo estadístico la presencia de tres grupos: Lutjanidae, Sciaenidae y Haemulidae. Nuestras muestras se agruparon en clado Haemulidae, lo que confirma la selección y había la presencia de cinco especies en los clados bien soportados, dos pudieron ser identificados: *Conodon nobilis* y *H. Parra*. Esto demuestra que el 16S como barcode es muy eficaz y que la identificación de todos los taxones no fue posible porque no hay representantes en *GenBank*. Los niveles de divergencia genética entre los grupos corroboran el estándar de separación en el árbol. Nuevos gens se pondrá a prueba para futura autenticación del grupo

## SEXADO DE FÉLIDOS DE LA SELVA PARANAENSE MEDIANTE TÉCNICAS INDIRECTAS

Schneider RG<sup>2</sup>, CF Argüelles<sup>2</sup>, KE DeMatteo<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biología - Universidad de Washington St. Louis EE.UU., <sup>2</sup>Laboratorio GIGA, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales Instituto de Biología Subtropical-Nodo Posadas- (UNAM-CONICET), Misiones.  
 e-mail: rosiogabrielasch@hotmail.com

Las técnicas indirectas de sexado de mamíferos son las herramientas de elección cuando la captura física del animal o mediante cámaras trampa es difícil, pero es factible contar con rastros, pelos o heces, que documentan su presencia. El objetivo del presente trabajo fue determinar la distribución y proporción de sexos en poblaciones naturales de yaguararé (*Panthera onca*), puma (*Puma concolor*), gato onza (*Leopardus pardalis*) y tirica (*Leopardus tigrinus*) en diferentes zonas de la Selva Paranaense de la Provincia de Misiones. Se analizaron regiones de los genes Zinc finger (*Y-linked Zinc finger protein*) y Amelogenina determinándose el tamaño de los fragmentos por secuenciación capilar en 175 muestras de ADN obtenidas a partir de las heces de dichos felinos, recolectadas con la ayuda de un perro detector entrenado para identificar estas especies. Mediante la combinación de ambos análisis se identificó el sexo en 159 de las 175 muestras (91%). Estas se agruparon según área de procedencia (Norte, Centro, Oeste). El número suficiente de muestras de tirica permitió un análisis estadístico binomial para probar la existencia de asimetrías en esta especie. Los resultados muestran que la proporción de machos vs hembras (38 machos: 49 hembras) no es significativa (test binomial 1macho:1hembra,  $p=0.284$ ) determinándose además que no existen diferencias significativas en la zona norte ( $p=0.70$ ), centro ( $p=1.00$ ) y sur ( $p=0.07$ ), concluyéndose que no existe asimetría en la distribución de sexos de tirica y que en la actualidad la especie se encuentra en equilibrio ecológico.

## ANÁLISIS MEDIANTE QPCR DE UN REARREGLO EN EL CROMOSOMA BOVINO 29 QUE CONTIENE AL GEN CAPN1

Motter MM<sup>1</sup>, PM Corva<sup>2</sup>, V Bayer<sup>1</sup>, LA Soria LA<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Genética. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA, <sup>2</sup>Unidad Integrada Balcarce (EEA-INTA/ Fac. Cs. Agrarias, UNMDP).

e-mail: lsoria@fvet.uba.ar

El objetivo del trabajo fue analizar una región del cromosoma bovino 29 (BTA29), que contiene genes vinculados a crecimiento, eficiencia y terneza de la carne, la cual podría presentar un rearrreglo estructural. Al analizar un marcador de terneza (CAPN1 316) del gen de la subunidad mayor de la  $\mu$ -calpaína (CAPN1) mediante PCR-RFLP con *BtgI*, se halló un patrón de restricción anormal en 3 toros y 4 novillos de dos razas bovinas para carne, en los cuales posteriormente se identificaron cuatro haplotipos distintos por clonación y secuenciación del fragmento amplificado (709 pb). Este resultado sería compatible con una variación en el número de copias (CNV, *Copy Number Variation*) del fragmento de referencia. Para evaluar la extensión del mismo se utilizó la cuantificación relativa mediante qPCR por el método del  $C_t$  comparativo y el número de copias se estimó mediante la fórmula  $2^{-ddCt}$ . Se analizaron tres regiones de CAPN1 en animales sospechosos y controles: extremo 5, región central y extremo 3 (44.063.396-44.063.476, 44.069.304-44.069.358 y 44.105.058-44.105.127 de AC\_000186-B. taurus UMD 3.1- respectivamente) utilizando como gen de referencia a BTF3 (*Basic Transcription Factor 3*, BTA20, 8.040.988-8.041.047 de AC\_000177-B. taurus UMD 3.1). Los resultados obtenidos sugieren que dicha región del BTA29 presenta un aumento del número de copias, lo cual justificaría un estudio más profundo para determinar la naturaleza del rearrreglo con el propósito de evaluar posteriormente las implicancias fenotípicas del mismo.

## ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN GENES INMUNES EN UNA POBLACIÓN DE CABALLOS CRIOLLO ARGENTINO

Corbi Botto CM<sup>1,2</sup>, SA Sadaba<sup>1,3</sup>, ME Zappa<sup>1</sup>, P Peral Garcia<sup>1</sup>, S Diaz<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout", (IGEVEV). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CCT La, <sup>2</sup>Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), <sup>3</sup>Becario de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

e-mail: ccorbi@fcv.unlp.edu.ar

La caracterización de una población es el primer paso en el camino hacia su conservación y utilización. El caballo Criollo es una de las razas referentes de la especie equina en Argentina, y por lo tanto, un patrimonio ganadero local que representa un recurso único en cuanto a la identidad y sistema productivo del país. El objetivo de este trabajo fue analizar una población de caballos Criollo Argentino del norte de Argentina por medio de la caracterización de la variabilidad genética de cuatro marcadores moleculares del tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) localizados en los genes que codifican para las citoquinas IL-12 y TNF- $\alpha$ . Se recolectaron muestras de pelo de 50 caballos de pura raza Criollo Argentino, se extrajo ADN genómico y se utilizó como molde para amplificación por PCR de 3 SNPs en el promotor del gen TNF- $\alpha$ , y 1 SNP ubicado en el exón 6 del gen IL-12. Los SNPs se detectaron por pirosecuenciación y se estimaron frecuencias génicas y genotípicas, equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y diversidad genética ( $H_e$ ,  $N_a$ ). En IL-12 se detectaron los alelos A y G, mientras que en TNF- $\alpha$  se observaron 5 haplotipos diferentes, entre ellos uno que no había sido reportado hasta el momento en otras razas equinas. Los resultados muestran que la heterocigosis esperada fue superior en TNF- $\alpha$  ( $H_e=0,764$ ) y la población se encuentra en equilibrio para el locus IL-12 ( $p$ -valor $>0,05$ ). Este estudio destaca la importancia del Criollo Argentino como acervo genético para el estudio de ciertas patologías que afectan a la especie equina.

## DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS EN CABALLOS DE LA RAZA ARABE IDENTIFICADOS POR MEDIO DE MICROSATÉLITES DEL MHC

Sadaba SA<sup>1,2</sup>, CM Corbi Botto<sup>1,2</sup>, ME Zappa<sup>1</sup>, MH Carino<sup>1</sup>, EE Villegas Castagnasso<sup>1</sup>, P Peral Garcia<sup>1</sup>, S Diaz<sup>1</sup>. <sup>1</sup>IGEVET, <sup>2</sup>BECARIO UNLP, <sup>3</sup>BECARIO CONICET.

e-mail: sebastiansadaba@yahoo.com.ar

La diversidad de los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es clave en su función en la presentación de antígenos en el sistema inmune. La tipificación indirecta basada en microsatélites (STR) del MHC aporta información de la variabilidad genética, la estructura poblacional, y es una estrategia para conocer procesos selectivos y evolutivos. Con el fin de caracterizar una población de caballos de raza Árabe, se identificaron los haplotipos del MHC sobre la base de tres microsatélites (UM011, DRB2-STR2 y COR112) abarcando una región de ~1Mpb. El ADN genómico se extrajo de sangre y pelo de 30 caballos de cinco Haras de la provincia de Buenos Aires, y los STRs se amplificaron con cebadores fluorescentes para tipificar en secuenciador automático. Se estimaron parámetros poblacionales y de diversidad, y la detección de haplotipos se realizó por análisis de segregación y con el programa de reconstrucción de haplotipos PHASE. Se reconocieron 14 haplotipos que pudieron verificarse en los registros de pedigree del Stud Book. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de ligamiento con alelos conocidos de genes de Clase II del ELA y la cantidad de haplotipos identificada permitió expandir la valoración de la diversidad del MHC equino. Esta metodología constituye una herramienta de utilidad y un método alternativo para la tipificación del MHC en linajes de caballos y en estudios poblacionales relacionados con la inmunidad.

## ¿CÓMO LLEGAR A TUS HOJAS? ENSAYO DE EXTRACCIÓN DE ADN DESDE MADERA DE DIFERENTES ESPECIES LEÑOSAS

Moreno AC<sup>1</sup>, FA Roig<sup>1,4</sup>, IE Peralta<sup>2,3</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Dendrocronología- IANIGLIA-CCT Mendoza- CONICET, <sup>2</sup>IADIZA- CCT Mendoza- CONICET, <sup>3</sup>Cátedra de Botánica Agrícola, Dpto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, <sup>4</sup>Cátedra de Dasonomía, Dpto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

e-mail: cmoreno@mendoza-conicet.gob.ar

Habitualmente resulta más difícil obtener ADN genómico de buena calidad desde árboles que desde el resto de los vegetales, debido a la presencia de contaminantes co-extraídos con el ADN. Además, la inaccesibilidad a las hojas en muchos ejemplares arbóreos impide la utilización de este tejido para la extracción. Se evaluaron tres protocolos de extracción de ADN desde madera de 14 especies pertenecientes a las familias Araucariaceae, Fabaceae, Ephedraceae, Loganiaceae, Anacardiaceae, Capparaceae, Asteraceae, Rhamnaceae y Zygophyllaceae. El material de partida fueron tarugos recién colectados, madera almacenada por 30 años, secciones en alcohol 70 %, en fijador (FAA) e incluidas en parafina. La calidad del ADN extraído se evaluó mediante espectrofotómetro y por amplificación de regiones *ITS*, *mat K*, *trn H* y *rb L*. Se presentan los resultados del éxito de amplificación de las combinaciones de tratamientos realizados involucrando las variables especie, protocolo de extracción y tipo de conservación. El kit comercial DNeasy Plant (Qiagen) con incorporación de PVP 2,6 % (p/v) en el buffer de lisis AP1 e incubación ON a 65°C, permitió la amplificación de las regiones seleccionadas en tarugos recién colectados, alcohol 70 % y madera seca, aunque con menor éxito al comparar con el tejido control (hoja). Los resultados de las muestras conservadas en FAA y parafina fueron variables, debido a la alteración física y química del ADN producida por estos tratamientos. Estos resultados posibilitan complement

## DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA AISLAR RETROTRANSPONES EN *Allium sativum* L.

Yañez Santos A<sup>1</sup>, M Gimenez<sup>1</sup>, R Paz<sup>2</sup>, S Garcia Lampasona<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, IBAM, CONICET UNCuyo, <sup>2</sup>Grupo INTERBIODES, CIGEOBIO (FCEFN-UNSJ/CONICET), <sup>3</sup>EEA Mendoza, INTA.

e-mail: magali.d.gimenez@gmail.com

El cultivo *in vitro* empleado para obtener plantas de ajo libres de virus puede provocar variación somaclonal. Una de las causas de esta variación son los cambios genéticos ocasionados por la activación de transposones. Actualmente el estudio de elementos genéticos móviles en ajo es limitado debido a que existe poca información del genoma de esta especie. A partir de geles de poliacrilamida de MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism), se aislaron y secuenciaron 3 fragmentos que presentaron homología con dominios conservados de proteínas estructurales de retrotransposones del orden LTR, Superfamilia Ty3-gypsy con longitudes de 304, 223 y 301 pb. Se identificaron como RNasa H, retrotranscriptasa (RT) e integrasa (INT) respectivamente. En base a estos resultados planteamos un nuevo objetivo de trabajo para desarrollar un método basado en PCR que permitiera detectar la expresión de genes de retrotransposones e identificar la secuencia de dichos elementos. Con esta finalidad se realizaron alineamientos de las secuencias obtenidas y de transposones homólogos que permitieron detectar las regiones más conservadas a nivel nucleotídico y proteico. Cebadores de secuencia idéntica a las regiones codificantes de los sitios activos de las enzimas se emplearon para la amplificación por PCR del cDNA que permitieron obtener fragmentos de longitud variable entre 700-1500 pb. Estos productos de amplificación, indicarían que distintas especies de transposones se estarían expresando activamente en el ARNm de plantas de ajo.

## ANÁLISIS DE ELEMENTOS REPETITIVOS NO-LTR EN TRES ESPECIES DE *Notolathyrus* (LATHYRUS, FABEA)

Scarpín J<sup>1</sup>, S Samoluk<sup>1</sup>, G Robledo<sup>1,2</sup>, G Seijo<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Botánica del Nordeste, <sup>2</sup>Universidad Nacional del Nordeste.

e-mail: jona\_sca@hotmail.com

Los genomas de plantas están constituidos por una gran fracción de secuencias repetitivas. El aumento y remoción diferencial de estas secuencias juegan un importante rol en la evolución genómica. La obtención de retrotransposones mediante PCR ha demostrado que existe una gran diversidad de ellos debido a que estos retroelementos son capaces de originar polimorfismo en un corto tiempo evolutivo. Con el objetivo de analizar la presencia, diversidad y distancia filogenética de elementos repetitivos no-LTR en el genoma de tres especies de la sección *Notolathyrus* (*L. macrostachys*, *L. crassipes* y *L. hasslerianus*), se aislaron 31 secuencias pertenecientes al gen de la transcriptasa reversa de retroelementos tipo LINEs y se las analizó mediante árboles aplicando el método Neighbor-Joining junto con secuencias LINEs de otras Eudicotiledóneas. Todas las secuencias aisladas fueron especie-específicas. En los árboles obtenidos, todas las secuencias de *Notolathyrus* formaron cuatro grupos exclusivos para la sección, separadas de las otras secuencias de Eudicotiledóneas. Sólo uno de estos cuatro grupos resultó ser especie-específico, el cual agrupa seis secuencias LINEs de *L. macrostachys*. El hecho de que casi todas las secuencias aisladas formen tres clusters exclusivos de *Notolathyrus* sugiere que estos LINEs han divergido antes de la diversificación de las especies utilizadas en este estudio. En cambio, aquellos retroelementos que forman el grupo exclusivo de *L. macrostachys* representan una explosión de un grupo de elementos particular a posteriori del surgimiento de dicha especie.

## RESISTENCIA A INHIBIDORES AHAS EN *Raphanus sativus* CONFERIDA POR UNA MUTACIÓN EN EL GEN DE LA ENZIMA

Pandolfo C<sup>1,2</sup>, A Presotto<sup>1,2</sup>, M Cantamutto<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto. de Agronomía, UNdelSur, <sup>2</sup>Conicet Bahía Blanca.

e-mail: cpandolfo@cerzos-conicet.gob.ar

El nabón (*Raphanus sativus* L.) es una maleza común de cereales y oleaginosas de la región pampeana. En 2012, se detectaron biotipos de nabón resistentes a herbicidas imidazolinonas (IMI) y sulfonilureas (SU), inhibidores de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS). Se evaluaron cuatro accesiones caracterizadas en ensayos previos como resistentes y como control se utilizaron dos de conocida susceptibilidad. Las plantas fueron criadas en invernadero y se tomaron muestras de hojas. Se extrajo ADN de las muestras y se secuenció la región del gen que codifica la enzima AHAS, flanqueada entre los primers WR122F y WR653R, que contiene todas las potenciales mutaciones que confieren resistencia a herbicidas. Además, se utilizó un marcador CAPS específico para la mutación Trp574Leu. Todas las accesiones resistentes presentaron un cambio de nucleótido en la posición 1720, que conllevó el cambio del aminoácido Trp a Leu en la posición 574. Los controles no presentaron esta mutación, aunque se observaron cambios de bases que no implicaron cambios de aminoácidos. En tres de las accesiones resistentes, la mutación se presentó en forma homocigota. La otra accesión resistente presentó plantas heterocigotas para el alelo de resistencia e individuos sin la mutación. Estos datos fueron congruentes con el nivel de resistencia y la segregación observada en esa accesión. Estos resultados confirman que la mutación Trp574Leu está presente en biotipos de *R. sativus* de Argentina, y que confiere resistencia cruzada a las cinco familias químicas de herbicidas inhibidores de la AHAS en esa especie.

## ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DEL PRIMER GENOMA CLOROPLASTÍDICO DE *Ilex dumosa*

Cascales J<sup>1,2</sup>, M Bracco<sup>1,2</sup>, L Poggio<sup>1,2</sup>, AM Gottlieb<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Citogenética y Evolución, EGE, IEGEBA (UBA-CONICET), FCEyN, UBA. Ciudad Universitaria, Pab II, 4to piso, Lab. 61-62, <sup>2</sup>CONICET.

e-mail: jcascales@ege.fcen.uba.ar

*Ilex dumosa*, la “yerba señorita”, pertenece al mismo género que la yerba mate, y con ella se elaboran infusiones equivalentes al mate, pero con menor contenido de cafeína. Esta característica, sumada a su mayor resistencia a factores bióticos y abióticos, la convierten en un reservorio de genes de interés agronómico para el mejoramiento de la yerba mate. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la genética básica. En este trabajo se obtuvo, por primera vez, la secuencia completa del genoma cloroplastídico de *I. dumosa*. Para esto se aislaron cloroplastos enteros, de los cuales se extrajo el ADN plastídico. El genoma fue secuenciado mediante *Whole Genome Sequencing* (WGS) en el INDEAR, usando la tecnología Roche 454. Se obtuvieron en total 232.018 pb en 1454 lecturas, que fueron ensambladas en 101 *contigs*. El análisis bioinformático realizado por nuestro grupo permitió obtener un plastoma consenso de 157 Kb, con una estructura cuatripartita típica (las regiones de copia única, mayor y menor, y dos regiones invertidas repetidas). La anotación funcional detectó 30 genes de tRNAs, 4 de rRNAs y 80 codificantes; de éstos 18 poseen intrones. Se detectaron 25 secuencias palindrómicas y 22 repeticiones directas (tamaño >30 pb). Se logró completar los *gaps*, y verificar las uniones entre las regiones, mediante el diseño de cebadores específicos y secuenciación de Sanger. La información generada en este estudio provee una base para el desarrollo de futuras tecnologías de transgénesis.

GGM 17

GGM 18

## CHLOROPLAST REPEAT SEQUENCES IN TWO PODOCARPACEAE: *Retrophyllum piresii* AND *Podocarpus lambertii*

Vieira LN<sup>1</sup>, H Faoro<sup>2</sup>, M Rogalski<sup>3</sup>, HPF Fraga<sup>1</sup>, EM Souza<sup>2</sup>, FO Pedrosa<sup>2</sup>, RO Nodari<sup>1</sup>, MP Guerra<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, Universidade Federal do Paraná, Brazil, <sup>3</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. e-mail: leilanvieira@gmail.com

The chloroplast (cp) genome mode of inheritance, paternal in most gymnosperms, allows us to elucidate the relative contributions of seed and pollen flow to the genetic structure of natural populations by comparison of nuclear and cp markers. The cp microsatellites, or SSRs, may be identified in completely sequenced plant cp genomes by simple database searches, followed by primers designed to screen for polymorphism. To date, studies of cp microsatellites have revealed much higher levels of diversity than have those of cp restriction fragment length polymorphisms (RFLP). We have analyzed the occurrence, type, and distribution of SSRs in the cp genome of two Brazilian native species from Podocarpaceae family: *Retrophyllum piresii* and *Podocarpus lambertii*. We identified 168 SSRs in *R. piresii* and 156 SSRs for *P. lambertii*. Among them, homo- and dipolymers were the most common for both species with, respectively, 96 and 62 for *R. piresii* and 80 and 63 occurrences for *P. lambertii*, whereas only 2 tri- and 8 tetrapolymers were identified in *R. piresii* and 4 tri-, 7 tetra-, 1 penta-, and 1 hexapolymers in *P. lambertii*. Most homopolymers are constituted by A/T sequences (91.66%; 87.5%, respectively), and of the dipolymers (56.45%; 61.1%, respectively) were also constituted by multiple A and T bases. These results reveal the presence of several SSR sites in both species analyzed. Hereafter, these sites can be assessed for the intraspecific level of polymorphism, leading to highly sensitive phylogeographic and population structure studies for this species.

## WEIGHTED GENE CO-EXPRESSION NETWORK ANALYSIS UNCOVERS CANDIDATE GENES FOR SEEDLING DEVELOPMENT

Higgins J<sup>1</sup>, I Bancroft<sup>1</sup>. <sup>1</sup>The Genome Analysis Centre, Norwich Research Park, Colney Norwich NR4 7UH, United Kingdom. e-mail: lisa.hunt@tgac.ac.uk

Seedling development is a critical stage of plant development and is therefore of high importance to plant breeders. We used a co-expression network analysis approach to find candidate genes that potentially played a critical role in seedling development in *Brassica napus*. Expression data was obtained for 99,048 unigenes for a population of 99 *B. napus* lines (96 double haploid lines plus parents, express and v8, and their fl) at 8 and 12 days after sowing. 42 traits from hormone profiling to field data were measured for the *B. napus* population. The expression datasets were used for consensus weighted gene co-expression network analysis ([labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/](http://labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/)); this extends the pairwise co-expression analysis to produce a measure of gene connectivity. Genes are then clustered into biologically meaningful modules based on the interconnection of genes. This module-centric approach can then be used to understand biological processes associated with specific traits. Genes which are found to be “central” within a module (intramodular hubs) are candidates for key regulators associated with the trait. We identified a number of interesting modules associated with hormones such as cytokinin, the circadian cycle and leaf development. Hubs within modules which were conserved between the 8 and 12 day timepoints were identified. These candidate genes were then assessed in the laboratory for their potential correlation with phenotypic variation found during seedling development.

## ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DURANTE LA FORMACIÓN DEL ENDOSPERMO DE *Paspalum notatum*

Depetris MB<sup>1</sup>, CA Acuña<sup>2</sup>, CL Quarin<sup>2</sup>, SA Felitti<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, S2125ZAA Zavalla, Sta Fe, Argentina. <sup>2</sup>Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), CONICET, Facultad de Cs Agr, UNNE, Sgto Cabral 2131, W3402BKG, Corrientes, Argentina. e-mail: maradepetris@hotmail.com

*Paspalum notatum* es una especie utilizada como modelo en estudios de genética reproductiva vegetal. El citotipo diploide es sexual y autoincompatible mientras que los poliploides son apomícticos, pseudógamos y autofértiles. La formación del endospermo en apomícticos no depende del aporte genómico 2:1 (materno:paterno), típico de las plantas sexuales y de la mayoría de las angiospermas. La formación del endospermo es un aspecto crucial en la perspectiva de incorporar el carácter apomixis a los cereales, ya que estos cultivos no producen granos si esa relación 2m:1p se desvía. Esto haría posible la fijación, el mantenimiento y la multiplicación por semillas de genotipos de interés. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el transcriptoma durante la formación de semillas provenientes de plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*. Se extrajo ARN de ovarios 24 hs después de la polinización y se analizó la expresión génica utilizando la metodología de cDNA-AFLP. Se logró secuenciar 91 transcriptos de expresión diferencial entre cruzamientos que forman semilla y otros que no forman semilla. Los resultados permitieron identificar transcriptos potencialmente relacionados con el éxito o el fracaso en el desarrollo del endospermo, involucrados en vías de transducción de señales y en la regulación de la transcripción, entre otras categorías funcionales. Esto contribuirá a comprender el mecanismo por el cual este sistema genera semillas independientemente de la estricta relación genómica materna y paterna (2m:1p) presente en la mayoría de las especies de gramíneas.

## EXPRESIÓN DE CPRECA EN PLÁNTULAS Y EMBRIONES DE CEBADA DE GENOTIPOS CPM Y SALVAJE Plantas

Lencina F<sup>1,2</sup>, A Landau<sup>1</sup>, ME Petterson<sup>1</sup>, V Brizuela<sup>1</sup>, MG Pacheco<sup>1</sup>, K Kobayashi<sup>2</sup>, A Prina<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Genética "E. A. Favret", CICVyA, CNIA, INTA Castelar. <sup>2</sup>Laboratorio de Agrobiotecnología, Departamento de Fisiología, Biología Celular y Molecular, FCEN, UBA. e-mail: lencina.franco@inta.gob.ar

Recientemente, hemos encontrado que la mutante de cebada *cpm* (genotipo mutador de cloroplastos) afecta una amplia gama de sitios del plastoma mediante mutaciones puntuales. Sin embargo, la presencia de cierto tipo de inserciones/deleciones (INDELS) de gran tamaño y de combinaciones particulares de polimorfismos en el gen *rpl23* y su pseudogen, sugieren que también ocurre un aumento de la recombinación homóloga en el plastoma. Con el objeto de estudiar si la recombinación aumentada es un efecto directo del *cpm* o se origina indirectamente, nos propusimos estudiar la expresión del gen *cpRecA*. Dicho gen nuclear se encuentra relacionado con la recombinación homóloga en el plastoma de *Arabidopsis*. En este trabajo se analizó su expresión por RT-PCR en diferentes tejidos de cebada *cpm* y salvaje. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos sobre las regiones presuntamente exónicas del ortólogo en cebada (MLOC 10667) y se amplificaron los transcriptos correspondientes a partir de ARN proveniente de hojas y de embriones. Se obtuvo ARN de buena calidad de ambos tejidos, se logró la amplificación del gen de actina y se consiguió una correcta amplificación del gen *cpRecA* de cebada. Si bien la metodología no permitió detectar diferencias de expresión entre los genotipos probados, permitió determinar que el gen *cpRecA* se expresa, en ambas líneas, a niveles notablemente superiores en los embriones respecto de las hojas. Esto señala a los embriones como el mejor material experimental para la cuantificación de *cpRecA* en cebada por RT-PCR en tiempo real.

## IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA, CITOLÓGICA Y MOLECULAR DE LÍNEAS DE GIRASOL CON SENESCENCIA CONTRASTANTE

Lopez A<sup>1</sup>, S Moschen<sup>1</sup>, S Villan<sup>1</sup>, N Paniago<sup>1</sup>, MP Lopez fernandez<sup>2</sup>, V Bugallo<sup>3</sup>, S Maldonado<sup>2</sup>, RA Heinz<sup>1</sup>, P Fernandez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>INTA Castelar, Instituto de Biotecnología, <sup>2</sup>FCEyN, UBA, <sup>3</sup>INTA Castelar, Instituto de Floricultura.  
e-mail: fernandez.pc@inta.gob.ar

La senescencia foliar es un mecanismo controlado por múltiples variables genéticas y ambientales que limitan el rendimiento de los cultivos. Es el último estadio en el desarrollo foliar, caracterizado por una declinación fotosintética, reciclado de nutrientes y muerte celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar el proceso de senescencia en líneas públicas endocriadas de girasol (*Helianthus annuus* L.) bajo condiciones naturales de campo, mediante análisis fisiológicos, citológicos y moleculares, de modo de identificar líneas contrastantes para la evaluación de este carácter de origen complejo. Un total de 10 (diez) líneas de girasol, que presentaron un comportamiento contrastante en el inicio de la senescencia en estudios fisiológicos previos, fueron evaluadas. Mediante un análisis de la evolución del área foliar verde y rendimiento se seleccionaron 4 líneas contrastantes, 2 que adelantaron la senescencia y 2 que la retrasaron en el ensayo a campo. El contraste observado fenotípicamente fue confirmado mediante técnicas moleculares de TUNEL, bandeado de ADN (DNA ladder) y citometría de flujo, que permitieron detectar la muerte celular programada asociada a la senescencia foliar, así como también posibles mecanismos de endoreduplicación. Estos resultados permitieron identificar 4 líneas contrastantes para el inicio del proceso, la puesta a punto de técnicas de evaluación citológica en una especie novedosa y su integración con variables moleculares, de modo de identificar nuevos biomarcadores asociados al proceso de senescencia foliar temprana en girasol.

## ANÁLISIS DE DATOS TRANSCRIPTÓMICOS Y METABOLÓMICOS PARA LA RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO EN GIRASOL

Moschen S<sup>1,2</sup>, CS Villan<sup>1</sup>, JA Di Rienzo<sup>3</sup>, T Tohge<sup>5</sup>, J Hollmann<sup>6</sup>, S González<sup>1,2</sup>, M Rivarola<sup>1,2</sup>, HE Hopp<sup>1,7</sup>, A Fernie<sup>5</sup>, K Krupinska<sup>6</sup>, N Paniago<sup>1,2</sup>, RA Heinz<sup>1,2,7</sup>, P Fernández<sup>1,2,3</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina, <sup>2</sup>CONICET, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, <sup>3</sup>Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Buenos Aires, Argentina, <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, <sup>5</sup>Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Alemania, <sup>6</sup>Botanisches Institut Biologie der Pflanzenzelle Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Alemania, <sup>7</sup>FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
e-mail: moschen.sebastian@inta.gob.ar

El déficit hídrico es uno de los estreses abióticos más relevantes que condiciona el rendimiento de los cultivos. Bajo estas condiciones, el metabolismo de la planta es perturbado y debe ser reconfigurado para mantener el metabolismo esencial y aclimatarse mediante la adopción de un estado de equilibrio. El objetivo de este trabajo fue la identificación de genes candidatos y vías metabólicas claves implicadas en la respuesta al déficit hídrico temprano en plantas de girasol, una especie con una tolerancia relativa mayor que otras especies, a través de un análisis integrado de perfiles de transcripción y metabólicos. Se llevó a cabo un experimento de campo bajo condiciones de déficit hídrico y control. Se realizó un análisis de micromatrices y GC-MS en muestras de hojas colectadas a diferentes tiempos de desarrollo. Genes y metabolitos relacionados con procesos de fotosíntesis y almacenamiento de compuestos fueron encontrados sobre-expresados bajo condiciones de déficit hídrico, mientras que aquellos relacionados a procesos de reciclado de nutrientes y senescencia fueron sub-expresados. Por otro lado, diversas secuencias con alta identidad a factores de transcripción fueron detectadas con altos niveles de expresión en etapas tempranas, postulándolas como potenciales activadores de esta respuesta. La identificación de nuevos genes y metabolitos asociados con la tolerancia a déficit hídrico ayudará a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes y permitir la generación de nuevas herramientas moleculares para su aplicación en las estrategias de mejoramiento de los cultivos.

## GENES CANDIDATOS EN RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO EN *Nothofagus*: ESTUDIO EN UN GRADIENTE PLUVIOMÉTRICO

Soliani C<sup>1,2</sup>, MV Arana<sup>1,2</sup>, P Marchelli<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche, <sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.  
e-mail: soliani.carolina@inta.gbo.ar

Las especies vegetales distribuidas en gradientes ambientales pueden mostrar respuestas adaptativas diferenciales, determinadas por las condiciones del hábitat local. Estas condiciones ejercen presión de selección sobre los individuos, determinando en muchos casos el establecimiento de clinas de variación genética. El objetivo de este trabajo es evaluar la diversidad en genes candidatos para la respuesta al estrés hídrico de dos especies forestales, *Nothofagus nervosa* y *Nothofagus obliqua*, distribuidas a lo largo de un gradiente pluviométrico. Con el fin de distinguir los efectos de eventos demográficos de los generados por selección, se realizó inicialmente un análisis de estructura genética utilizando microsatélites (SSRs). Se genotipificaron 437 individuos provenientes de 13 poblaciones con 14 SSRs. Con el fin de estudiar la señal de selección en genes de respuesta a estrés hídrico, se diseñaron primers para 18 genes putativos a partir de secuencias disponibles del transcriptoma de *N. nervosa*. Se logró una óptima amplificación y secuenciación de 8 genes en *N. nervosa* y *N. obliqua*. La variación encontrada en estos genes se debe mayoritariamente a diferencias entre especies, sin embargo se detectaron individuos heterocigotos que confirmarían la presencia de marcadores a nivel de nucleótido (SNPs). Dadas las tolerancias hídricas distintivas de cada especie, los resultados podrían estar reflejando adaptaciones locales. Actualmente, se está estudiando la posible señal de selección sobre estos genes, en poblaciones distribuidas a lo largo del gradiente pluviométrico.

## IDENTIFICACION MOLECULAR DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL ASOCIADAS A CULTIVOS DE HORTALIZAS

Galvis NF<sup>1</sup>, Z Galvis<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Investigador del grupo de Investigación Majumba de la Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia.  
<sup>2</sup>Joven Investigador de Colciencias del grupo de Investigación Majumba de la Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, Colombia.  
e-mail: fgs999@hotmail.com

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizosfera de la planta, lo cual favorece su crecimiento y desarrollo. En este trabajo se aislaron 34 cepas nativas de bacterias diazótroficas, a partir de muestras de suelo rizosférico de cultivos de hortalizas, las cuales fueron identificadas como *Azotobacter sp.*, *Azospirillum sp.*, *Burkholderia sp.* y *Pseudomonas sp.* mediante medios selectivos y pruebas bioquímicas. Posteriormente se realizó la identificación molecular a través de la reacción en cadena de la polimerasa, diseñando cebadores específicos para la identificación de *Azotobacter chroococcum*, *A. chroococcum*, *A. nigricans*, *A. vinelandii*, *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens*, *A. lipoferum*, *Burkholderia tropica*, *B. vietnamiensis*, *Pseudomonas putida*. En la identificación molecular mediante PCR utilizando los cebadores diseñados se logró la determinación de *P. putida*, *A. chroococcum* y *A. brasilense*. La identificación de estas rizobacterias permitió comprobar la especificidad de los cebadores diseñados en este trabajo para ser utilizados en el diagnóstico molecular; y además, estos microorganismos podrían emplearse como potenciales biofertilizantes; comprobándose su efecto a nivel de invernadero, con un suelo no estéril, para compararlo con los microorganismos nativos y condiciones controladas, con posibilidades de ser aplicados en campo en cultivos de interés agronómico.

GGM 25

## OPTIMIZACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DESDE SANGRE PERIFÉRICA

Alvarez MF<sup>1</sup>, JM Mondaca<sup>1</sup>, MA Palavecino Nicotra<sup>1</sup>, S Siewert<sup>1</sup>, I Gonzalez<sup>1</sup>, MS Ojeda MS<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Diabetes - Universidad Nacional de San Luis. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. San Luis, Argentina.  
e-mail: micaalvarez925@gmail.com

**Introducción:** La extracción de ADN se realiza para obtener moléculas con alto grado de pureza y utilizarlas para PCR. **Objetivo:** evaluar dos métodos de extracción de ADN a partir de muestras de sangre para su posterior empleo en la técnica de PCR. Se utilizó un equipo comercial QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen) y un protocolo optimizado en nuestro laboratorio. **Método optimizado:** 500 µl de sangre fueron homogenizados en 1000 µl de Buffer de Lisis de glóbulos rojos, se incubó 10 minutos (min) a temperatura ambiente (T° amb). Todas las centrifugaciones se realizaron a 12.000 rpm. Se centrifugó 10 min., se descartó el sobrenadante y se añadió 1000 µl de agua destilada estéril. Se mezcló por inversión, se centrifugó 4 min. Al pellet se le agregó 400 µl de STE, 40 µl de SDS al 10% y 10 µl de proteinasa K (20mg/ml). Se mezcló y se incubó 20 min. a 60 °C. Se añadieron 500 µl de cloroformo isoamílico (24:1) y se mezcló hasta emulsionar las fases. Se centrifugó 10 min. Al sobrenadante se adicionó 40 µl de NaCl 3M, 700 µl de isopropanol frío. Se incubó 20 min. a -20 °C, se centrifugó 10 min. y el precipitado se lavó con etanol (70 %). Se secó a T° amb, y se disolvió en 50 µl de TE. **Resultados:** La comparación entre métodos no mostró diferencias respecto a la integridad y pureza de los ADNs y resultaron óptimos para PCR, con concentraciones de 100 a 300 ng/µl para Qiagen y de 1 a 50 ng/µl en nuestro protocolo. **Conclusiones:** El protocolo optimizado es de bajo costo, rápido, óptimo para PCR y no involucra la utilización de fenol para la extracción de ADN.

GGM 26

## OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN HFE

Parellada ME<sup>1</sup>, M Cervera<sup>1</sup>, SE Lazarte<sup>1</sup>, BA Issé<sup>1</sup>, ME Mónaco<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Cátedra de Bioqca Clínica I Fac de Bioqca. Qca y Fcia Universidad Nacional de Tucumán, <sup>2</sup>Laboratorio Tucumán.  
e-mail: emonaco@fbqf.unt.edu.ar

La β-talasemia es debida a la deficiente producción de cadenas de beta globina, constituye la principal causa de anemia hereditaria y se caracteriza por presentar eritropoyesis ineficaz y desbalance férrico. La homeostasis del hierro es un proceso regulado por la hepcidina, la cual es modulada a nivel transcripcional por las interacciones entre la proteína HFE y los receptores de transferrina. La presencia de mutaciones del gen HFE potenciarían el desbalance férrico en portadores del rasgo β-talasémico por lo que su identificación facilitaría el manejo clínico de los mismos evitando estados de sobrecarga férrica. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y optimizar una técnica de PCR en tiempo real para la detección de las mutaciones C282Y, H63D y S65C en el gen HFE utilizando sondas FRET. Se diseñaron los cebadores y sondas, se optimizó el perfil de ciclado y la concentración de iones Mg para una PCR asimétrica. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo: 0,06 µM del primer forward; 0,2 µM del primer reverse; 0,2 µM de cada sonda fluorescente y 2 µl de DNA. El perfil de ciclado fue el siguiente: activación de la enzima y desnaturalización de la muestra, 94°C por 8 min; seguido por 42 ciclos de desnaturalización a 95°C 8 seg; annealing a 53°C 12 seg y extensión a 72°C 12 seg. El ensayo fue evaluado empleando controles heterocigotas para cada mutación y el análisis de las temperaturas de melting (Tm) de los fragmentos amplificados permitió la diferenciación entre los alelos salvajes y los alelos mutados del gen HFE.

## DETERMINACIÓN DEL VIRUS DENGUE EN *Aedes aegypti* MEDIANTE RT-PCR EN EL ÁREA METROPOLITANA DE SAN JOSÉ DE CÚCUTA

Galvis NF<sup>1</sup>, C Lozano<sup>2</sup>, F Quintero<sup>2</sup>, S Peñaranda<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Lider grupo de Investigación Biogen de la Universidad de Santander, Cúcuta, Colombia, <sup>2</sup>Investigadores del grupo de Investigación Biogen de la Universidad de Santander, Cúcuta, Colombia, <sup>3</sup>Estudiante de pregrado de Bacteriología de la Universidad de Santander, Cúcuta, Colombia.  
e-mail: fgs99@hotmail.com.

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por la infección con cualquiera de los serotipos de virus denominados DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4. Los virus son transmitidos al hombre a través de mosquitos del género *Aedes* sp., siendo *A. aegypti* el vector más importante en las Américas. La infección viral causa un espectro de manifestaciones clínicas, desde una enfermedad febril leve hasta un cuadro hemorrágico severo y fatal, dependiendo de la secuencia de serotipos de virus infectantes, estado inmune, edad y características genéticas del individuo. El objetivo de este proyecto es el de identificar los 4 serotipos del virus dengue en *A. aegypti* mediante RT-PCR, permitiendo medir la frecuencia del virus en el vector en una época del año, en los municipios Villa Rosario, Los Patios, El Zulia, Puerto Santander y San Cayetano. En los resultados de la RT-PCR se observó producto en 5 de 22 pools analizados, identificando el serotipo 1 en 1 pool y el serotipo 4 en 4 pools, en el municipio de Villa del Rosario. En el análisis estadístico, se estableció que un 5.49% de los pools fueron positivos y corresponden a 5 de los 91 pools totales, analizados en este estudio, identificando los serotipos 1 y 4 en Villa del Rosario. Medir la frecuencia del virus en el vector en diferentes épocas del año serviría de advertencia para tomar medidas preventivas en el control del vector y de futuras epidemias en la región.

## CARACTERIZACIÓN DE GENES CYP21A2/ CYP21A1P EN LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

Fernández C<sup>1</sup>, N Buzzalino<sup>1</sup>, M Taboas<sup>1</sup>, L Espeche<sup>1</sup>, M Delea<sup>1</sup>, M Stivel<sup>2</sup>, L Alba<sup>1</sup>, L Dain<sup>1,3</sup>. <sup>1</sup>Centro Nacional de Genética Médica-ANLIS, <sup>2</sup>División Endocrinología, Hospital Durand, <sup>3</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.  
e-mail: cecisolfer@gmail.com

El gen *CYP21A2* codifica la enzima 21-hidroxilasa, cuya deficiencia es la principal causa de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. El gen forma parte del módulo RCCX, que está generalmente duplicado y repetido en tándem. Como consecuencia los cromosomas poseen un gen activo y un pseudogen inactivo. La elevada identidad de secuencia entre ambos favorece la recombinación desigual y la transferencia de secuencias del pseudogen al gen por conversión génica, las que generan *CYP21* quimeras e híbridos, respectivamente. En trabajos previos se caracterizó la región RCCX en 237 pacientes. Se identificaron 15 alelos con genes quimeras por delección y 13 con genes híbridos por macroconversión. En este trabajo se presenta la caracterización de estos alelos con el fin de delimitar el punto de ruptura en la delección o la región donde finalizó la conversión génica. Para cada paciente se amplificó un fragmento específico, que se usó para amplificar la región de interés y secuenciarla. Se identificaron 5 quimeras diferentes entre los 15 alelos con delección del gen, similares a las reportadas. Entre los 13 alelos convertidos, se identificaron 4 regiones distintas donde finalizaron las macroconversiones, que fueron similares a las regiones de los puntos de ruptura en las delecciones. Estos resultados sugerirían que la recombinación y la conversión génica estarían íntimamente ligadas, y que estos 2 mecanismos (principales generadores de mutaciones) producen diversidad de alelos deficientes y colaboran con la elevada variabilidad de la región.

## DETECTION OF MUTATIONS IN *BRCA1* AND *BRCA2* OF BREAST CANCER BY MASSIVE PARALLEL SEQUENCING

Galeano Petro L<sup>1,2</sup>, G Guevara Pardo<sup>2</sup>, H Groot de Restrepo<sup>1</sup>, MC Lattig Matiz<sup>1</sup>, D Restrepo Montoya<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Universidad de los Andes, <sup>2</sup>Instituto Colombiano de Genética y Oncología Molecular.  
e-mail: lilianag7@gmail.com

This study describes how the massive parallel sequencing technology can be implemented in a diagnostic setting for the breast cancer susceptibility genes, *BRCA1* and *BRCA2*. At the present, genetic testing is offered in many centers in North America, Europe, Australia and Israel, but is not generally available in developing countries as Colombia, South America. Genetic testing is gaining acceptance worldwide because of the increasing numbers of preventive options available to women with a mutation. We performed deleterious mutations and variant of unknown significance analysis of *BRCA1* and *BRCA2* on patients with breast cancer in Colombia using massively parallel sequencing. Of 250 patients, initially sequenced by the method of Sanger, 24 patients were subselected for the massive parallel sequencing of *BRCA1* and *BRCA2*. The throughput was maximized by increasing uniformity in coverage, obtained by target enrichment of *BRCA1* and *BRCA2* in 21 amplicons ranging from 1.2-5.9kb and 6 reactions by long PCR multiplex approach and sequencing the fragments library in 5500xl SOLiD Sequencer and analysis by LifeScope software. Deleterious mutations and variants of unknown significance were identified and confirmed by Sanger sequencing with 100% concordance. Our workflow illustrates the potential of massive parallel sequencing of large genes in a diagnostic setting which is of great importance to meet the increasing expectations of genetic testing. A wider spectrum of women at risk in Colombia will be able to benefit from therapeutic and prophylactic interventions.

## GENETIC POLYMORPHISMS IN XENOBIOTIC METABOLIZING AND SPORADIC COLORECTAL CANCER

Fernandes GMM<sup>1</sup>, A Russo<sup>1</sup>, MA Proença<sup>2</sup>, A Silva<sup>2</sup>, GS Cunrath<sup>3</sup>, JG Netinho<sup>3</sup>, EC Pavarino<sup>1,4</sup>, EM Goloni-Bertollo<sup>1,4</sup>. <sup>1</sup>Research Unit in Genetics and Molecular Biology - UPGEM / São José do Rio Preto Medical School FAMERP; São José do Rio Preto - SP, Brazil, <sup>2</sup>São Paulo State University - UNESP; São José do Rio Preto - SP, Brazil, <sup>3</sup>Department of Surgery - FAMERP; São José do Rio Preto - SP, Brazil, <sup>4</sup>São José do Rio Preto Medicine School Fundation - FUNFARME; São José do Rio Preto - SP, Brazil.  
e-mail: eny.goloni@famerp.br

Genetic polymorphisms involved with xenobiotic metabolizing may modulate the development of cancer. This study investigated the CYP1A1\*2A, CYP1A1\*2C, CYP2E1\*5B, CYP1E1\*6, Tyr113His EPHX1 and His139Arg EPHX1 polymorphisms related to xenobiotic metabolizing in the risk of sporadic colorectal (SCRC) cancer and the interaction of these polymorphisms with lifestyle (smoking and drinking), clinical and histopathological parameters and socio-demographic factors. A case-control study was conducted in 641 subjects in the Brazilian population (241 patients with SCRC and 400 controls). Real-Time PCR and PCR-RFLP was performed for genotyping. Statistical analysis was performed using multiple logistic regression binary. The results showed statistically significant differences between the case and control groups for age greater than 50 years (OR=8.21, 95%CI=5.49-12.28, p<0.01) and male gender (OR=0.50, 95%CI=0.32-0.87, p<0.01) The analysis of polymorphisms revealed an association between the alleles polymorphic CYP2E1\*5B (OR=2.84, 95%CI=1.78-4.52, p<0.01, additive model) and CYP2E1\*6 (OR=2.78, 95%CI=1.91-4.06, p<0.01, additive model) and the SCRC. Tumor size, lymph node involvement and disease primary site were not associated with polymorphisms. The CYP2E1\*5B and CYP2E1\*6 polymorphisms are involved in the risk of SCRC and individuals with age  $\geq$  50 years are more susceptible to this tumor type, while those of males are less susceptible. Financial Support: FAPES; CAPES; CNPq. Support: FAMERP/FUNFARME.

## EXPRESIÓN GÉNICA Y NIVEL SÉRICO DEL VEGF EN PACIENTES CON CARCINOMA HEPATOCELULAR, VHC O CIRROSIS

Ferreira RF<sup>1</sup>, V Nogueira<sup>1</sup>, RCMA Silva<sup>1</sup>, GD Tenani<sup>1</sup>, MAS Pinhel<sup>1</sup>, DRS Souza<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

e-mail: rafael91\_fernandes@hotmail.com

El objetivo fue analizar la expresión génica y los niveles séricos de VEGF, su sensibilidad y especificidad, en pacientes con CHC, cirrosis, VHC y controles. Para la determinación de los valores de expresión génica relativa, se han estudiado 80 individuos: La dosificación de VEGF fue realizada por ELISA para 20 pacientes de cada grupo. Niveles de expresión génica de biopsias hepáticas fueron analizados por Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa para G1 10 con CHC; G2 12 cirróticos por cualquier etiología; G3 06 VHC sin cirrosis; G4 12 controles. El análisis estadístico ha comprendido test t, test exacto de Fisher o Chi-cuadrado, curva ROC y ANOVA ( $P < 0,05$ ). El análisis de la expresión génica relativa para VEGF fue parecido entre los grupos ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, se ha destacado la expresión del referido gen para pacientes con cirrosis ( $G2 = 160,4 \pm 343,8$ ), comparado a pacientes con CHC ( $G1 = 1,74 \pm 3,27$ ) o VHC ( $G3 = 86,9 \pm 20,8$ ). Niveles séricos aumentados de VEGF fueron observados en G1 ( $588,0 \pm 501,0$  pg/mL) comparado a G2 ( $173,0 \pm 113,0$  pg/mL), a G3 ( $273,0 \pm 189,0$  pg/mL) y a G4 ( $190,0 \pm 188,0$  pg/mL;  $P < 0,01$  para todos). La diferenciación del grupo con CHC del grupo con cirrosis utilizando nivel sérico del VEGF se ha destacado con sensibilidad de 65% y especificidad de 85% [área bajo la curva = 0,8175 (0,66 a 0,98)]. La expresión génica de VEGF no ha presentado asociación al CHC; sin embargo, los niveles séricos elevados de esa glicoproteína en individuos con CHC puede utilizarse como indicador de desarrollo de tumor en pacientes con cirrosis, sugiriéndolo, así, como potencial marcador para este tipo de cáncer.

## DIFERENCIACIÓN DEL GEN OPRM1 EN UNA MUESTRA HOSPITALARIA BONAERENSE

Pascua M<sup>1</sup>, GP Di Santo Meztler<sup>1</sup>, R Ferrando<sup>2</sup>, D Finkel<sup>2</sup>, CI Catanesi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Lab. de Diversidad Genética IMBICE, La Plata, <sup>2</sup>Div. Anestesiología, Hospital General de Agudos Dr. J. M. Ramos Mejía, GCBA.

e-mail: malen\_lauri\_tr@hotmail.com

La población argentina presenta diferencias en las frecuencias de los polimorfismos de genes asociados con la sensibilidad al dolor, por ejemplo en los genes COMT e IL1RN. El receptor opioide mu es el objetivo y principal puerta de entrada de las sustancias analgésicas opioides, tanto endógenas como exógenas, y el gen que lo codifica, OPRM1, presenta diversos polimorfismos que afectan la función del receptor. Con el fin de conocer la variación de este gen en nuestra población, se analizaron 6 SNPs de OPRM1 en muestras de ADN de 75 pacientes donantes voluntarios de la División Anestesiología del Hospital Ramos Mejía, Ciudad de Buenos Aires. Mediante PCR-RFLP se analizaron: rs1799971, rs1799972, rs17174794, rs2075572, rs540825 y rs562859. La diversidad génica promedio fue de  $0,3693 \pm 0,2692$  y la heterocigosis media observada de 25,56%. Los marcadores se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). En la comparación con datos de Resistencia y Corrientes, se hallaron diferencias significativas con ambas provincias (test exacto basado en frecuencias genotípicas y Fst,  $p < 0,05$ ). Aunque requieren ser corroborados en una muestra de mayor tamaño, estos resultados mostrarían el efecto de una contribución diferencial de los componentes nativo y europeo en las distintas provincias argentinas.

## VARIANTES GENÉTICAS DE LA APOLIPOPROTEÍNA-E Y EL PERFIL LIPÍDICO EN LA DEGENERACIÓN MACULAR

Cezario SM<sup>1</sup>, MCJ Calastri<sup>1</sup>, CC Cotrim<sup>2</sup>, MAS Pinhel<sup>2</sup>, ML Gregório<sup>1</sup>, MF Godoy<sup>1</sup>, R Jorge<sup>2</sup>, DRS Souza<sup>1</sup>, RC Siqueira<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, SP-Brasil, <sup>2</sup>Facultad de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP, SP-Brasil.  
e-mail: sabrina-mayara@hotmail.com

**Introducción** - Degeneración macular relacionada con la edad (DMRI) resulta en la pérdida de la visión central, se destacando el metabolismo de lípidos en la patogénesis de la enfermedad y su asociación con apolipoproteína-E (apo E), lo que necesita esclarecimiento debido a informes contradictorios en la literatura. **Objetivo:** Evaluar la asociación del polimorfismo *APOE-HhaI* y el perfil de lípidos con DMRI. **Metodología** - Se realizó genotipificación de *APOE* en 134 pacientes (G1) y 164 controles (G2). Perfil lipídico incluyó colesterol total (CT), fracciones (LDLc, HDLc) y triglicéridos (TG) analizado en 30 personas en ambos os grupos, emparejados por edad y sexo. Nivel de significación  $P < 0,05$ . Resultados - *APOE\*3/E3* prevaleció (G1=74,6; G2=77,4%), sin diferencia significativa entre los grupos ( $P=0,667$ ) lo mismo ocurrió en genotipos de riesgo (*APOE\*E2/\_*: G1=7,4; G2=10,3%,  $P=0,624$ ). Niveles serológicos de CT, LDLc y TG mostró medianas similares ( $P > 0,05$ ) en G1 (193,5; 116; 155mg/dL) y G2 (207,5; 120; 123,5mg/dL). Para HDLc se notaron niveles elevados en G2 (53,3mg/dL) versus G1 (42,5mg/dL;  $P=0,0163$ ) en el análisis de regresión logística, cuya razón HDLc/CT mostró coeficiente -11,423 ( $P=0,014$ ). Distribución del perfil de lípidos en genotipos de riesgo en relación con homocigoto salvaje (*APOE\*3/E3*) mostró ninguna diferencia entre los grupos, con excepción de CT (G2=220 versus G1=193mg/dL;  $P=0,008$ ). **Conclusión** - *APOE-HhaI* no esta asociada a AMD, no obstante, el aumento del nivel de HDLc parece resultar en menos riesgo para la enfermedad independiente de los genotipos de apo E.

## VARIANTES GENÉTICAS PARA ANGIOGÉNESIS Y METABOLISMO DE LÍPIDOS EN LA DEGENERACIÓN MACULAR

Calastri MCJ<sup>1</sup>, SM Cezario<sup>1</sup>, FTI Gonçalves<sup>1</sup>, MAS Pinhel<sup>2</sup>, CC Cotrim<sup>2</sup>, CIF Oliveira<sup>1</sup>, MF Godoy<sup>1</sup>, KNS Oliveira<sup>1</sup>, R Jorge<sup>2</sup>, DRS Souza<sup>1</sup>, RC Siqueira<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, SP-Brasil, <sup>2</sup>Facultad de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP, SP-Brasil.  
e-mail: sabrina-mayara@hotmail.com

**Introducción** - Degeneración macular relacionada a la edad (DMRI) resulta en la pérdida de la visión central, destacándose factores genéticos relacionados al metabolismo de lípidos y mecanismos de neovascularización en la patogénesis de la enfermedad. **Objetivo:** Evaluar la influencia de polimorfismos del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF-C936T*) y apolipoproteína E (*APOE-HhaI*), y su relación con comorbilidades y hábitos de vida en la DMRI. **Material y Métodos:** Se ha realizado análisis de los referidos polimorfismos en 134 pacientes (G1) y 164 controles (G2), en la franja etaria entre 50-89 años, evaluados también con respecto al índice de masa corporal, tabaquismo y etilismo. Se ha admitido nivel de significancia  $P < 0,05$ . **Resultados:** En ambos grupos prevalecieron genotipos homocigóticos salvajes de *VEGF-C936T* (CC - G1=75%; G2=79%;  $P=0,4174$ ) y *APOE-HhaI* (*APOE\*3/E3* - G1=74,6%; G2=77,4%;  $P=0,667$ ), sin diferencia significativa entre los grupos, lo mismo ha pasado a los genotipos de riesgo (*APOE\*E2/\_ + T/\_*: G1=2,9%; G2=2,4%;  $P=1,0$ ) y de protección (*APOE\*E4/\_ + C/\_*: G1=14,9%; G2=9,8%;  $P=0,3$ ), así como para las demás variables ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, el análisis de regresión logística ha mostrado el tabaquismo como variable independiente para DMRI con coeficiente de 0,514148 ( $P=0,047$ ). **Conclusión** Factores genéticos relacionados a la angiogénesis (*VEGF-C936T*) y metabolismo de lípidos (*APOE-HhaI*) no se asocian a DMRI; sin embargo, el tabaquismo se muestra como factor de riesgo independiente para la enfermedad.

## CARACTERIZACIÓN DE UNA DELECIÓN DE 165 Kb DEL F8 POR RECOMBINACIÓN NO-HOMÓLOGA CAUSAL DE HEMOFILIA

Abelleyro MM<sup>1</sup>, LC Rossetti<sup>1</sup>, CP Radic<sup>1</sup>, VD Marchione<sup>1,2</sup>, M Candela<sup>1,2</sup>, IB Larripa<sup>1,2</sup>, CD De Brasi<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia, IMEX, CONICET-Academia Nacional de Medicina, Argentina, <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex, Academia Nacional de Medicina.  
e-mail: martinabelleyro@gmail.com

Las grandes deleciones del F8 representan el 8–15% de las hemofilias A severas (HAs) y predisponen al desarrollo de inhibidores terapéuticos, anticuerpos anti-factor VIII. Este trabajo presenta la caracterización molecular completa de una gran deleción del F8 detectada en un paciente con HAs e inhibidor de alto título (>5UB/dL) por ausencia consistente de amplificación del exón 3 al 26 (último exón del F8). Para identificar la región 3' de la deleción se diseñó un abordaje de análisis de acercamiento por bipartición: cinco amplímeros ubicados a 100, 50, 25, 12 y 6kb río-abajo del F8-exón 26 todos positivos en el paciente hemicigota. La amplificación PCR de larga distancia desde el F8-exón 2 hasta el producto de amplificación de 6Kb rindió una señal específica del alelo mutado de ≈4kb cuyo análisis de restricción múltiple y secuenciación permitió diseñar primers en el F8-IVS2 y F8+3,5kb para la amplificación PCR-estándar de la deleción para el diagnóstico molecular directo del paciente, su madre y dos hermanas. La secuenciación de este producto específico de 661bp permitió caracterizar una deleción de 165.297bp (ChrX:154226532-154061235), NM\_000132.3:c.[265+1220\_\*4636del165297;265+1220\_265+1221insAG]. Los extremos de la ruptura (F8-IVS2::F8+3,5kb) no presentan elementos repetidos interdispersos, ni repeticiones de pocas copias, indicando un mecanismo de recombinación no-homóloga por defectos en la reparación de rupturas por unión de extremos no-homólogos (NHEJ), o alternativamente, defectos en la replicación por *Fork Stalling-Template Switching* (FoSTeS).

## EIF4E MULTIFACÉTICA: DE LA TRADUCCIÓN A LA GENERACIÓN DE ARRITMIAS CARDÍACAS

Santalla M<sup>1,2</sup>, CA Valverde<sup>2</sup>, E Lacunza<sup>3</sup>, A Mattiazzi<sup>2</sup>, P Ferrero<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigaciones Cardiovasculares. UNLP-CONICET, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. UNNOBA, <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas. UNLP-CONICET.  
e-mail: santallamanuela@gmail.com

El factor eucariota de inicio de la traducción eIF4E ha demostrado ser una molécula versátil, con otras funciones diferentes a la traducción, destacándose como posible molécula arritmogénica en el corazón de *Drosophila melanogaster*. Aquí estudiamos el rol de eIF4E en la fisiopatología cardíaca de *Drosophila* a través de la ventaja que ésta provee como modelo genético. La alta homología entre sus genes y los de mamífero permite extrapolar los resultados al humano. Caracterizamos la frecuencia cardíaca, el aumento transitorio de calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>) y la generación de arritmias en líneas mutantes con niveles diferenciales de expresión de eIF4E. Se midió el efecto de la reducción de eIF4E en una línea que posee una mutación puntual (G-A) en el sitio aceptor de splicing del segundo intrón del gen eIF4E1/2 que resulta en una proteína truncada no funcional. Las moscas se cruzaron con una línea transgénica portadora de un sistema reportero que sensa cambios en el Ca<sup>2+</sup>. La reducción parcial sistémica de eIF4E aumentó la frecuencia cardíaca (103,21 vs 70,73 lat/min) y disminuyó el índice de arritmias (0,19 vs 0,32 seg) con respecto a las moscas control a los 7 días de edad. Se observó una disminución en el tiempo desde el inicio del aumento del transitorio hasta su máximo (0,14 vs 0,19 seg) y en la máxima velocidad de contracción (0,5 vs 0,77 Unidades de fluorescencia/seg). Los resultados indican un rol de eIF4E en el manejo del Ca<sup>2+</sup>, la frecuencia cardíaca y la generación de arritmias independientemente de su papel como factor de inicio de la traducción.

## DETECCIÓN DE VARIANTES DEL GEN *ELN* EN PACIENTES CON SÍNDROME DE WILLIAMS

Delgado ML<sup>1</sup>, G Ercoli<sup>1</sup>, P Manso<sup>2</sup>, D Cisterna<sup>3</sup>, E Pastene<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro Nacional de Genética Médica, Dr. Eduardo E Castilla, ANLIS, Malbrán, CABA, <sup>2</sup>Hospital El Cruce, Nestor Carlos Kirchner, Florencio Varela, Prov. Buenos Aires, <sup>3</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS, Malbrán, CABA.  
e-mail: lmdbsas2003@yahoo.com.ar

El gen *ELN* está localizado en la región de delección del Síndrome de Williams (SW). La delección de *ELN* es causante de la estenosis supra valvular aórtica, característica típica del fenotipo y la principal causa de morbilidad y mortalidad. Si bien, todos los pacientes con SW tienen delección de *ELN*, el fenotipo cardiovascular es muy variable en cuanto a su gravedad y más del 20% de los pacientes no lo presentan. El objetivo fue investigar variantes en el gen *ELN* que pudieran estar implicadas en la variabilidad genética del fenotipo cardiovascular y que compensarían la dosis genética, en aquellos casos que no presentan cardiopatías. Para este estudio se secuenciaron 33 fragmentos del gen *ELN* en hemicirosis en una cohorte inicial de 25 pacientes con SW. Cada paciente fue investigado por ecocardiografía doppler color. La mayor parte de las variantes encontradas fueron de alta frecuencia, localizadas en regiones codificantes, no codificantes y 3'UTR incluyendo un par de variantes no registradas en la base de datos NCBI-SNPdb. Las variantes codificantes fueron calificadas como no deletéreas con software predictivos tales como Polyphen y SIFT. Los resultados preliminares obtenidos a la fecha no muestran correlación evidente entre variantes de *ELN* y las cardiopatías, seguimos estudiando pacientes a fin de alcanzar una muestra estadísticamente significativa. Determinar la presencia de modificadores genéticos que influyan en la expresión del gen *ELN*, o en la función de la elastina, conducirían a desarrollar estrategias terapéuticas para compensar dichos mecanismos patogénicos.

## ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE FIBROSIS QUÍSTICA A PARTIR DE LA PESQUISA NEONATAL EN PROVINCIA DE SANTA FE

Benetti S<sup>1</sup>, P Flaherty<sup>2</sup>, A Gutierrez<sup>2</sup>, S Lejona<sup>1</sup>, E Gentini<sup>1</sup>, T Spalding<sup>1</sup>, M Wagener<sup>3</sup>, F Meneghetti<sup>3</sup>, J Ruatta<sup>3</sup>, I Lande<sup>4</sup>, L Gallardo<sup>4</sup>, L Maggi<sup>5</sup>, A Arguelles<sup>5</sup>, L Chertkoff<sup>6</sup>, P Gravina<sup>6</sup>, G Dip<sup>1</sup>, E Anchart<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Biología Molecular- Secretaria de Salud Pública – Municipalidad de Rosario, <sup>2</sup>Redes de Laboratorio - Ministerio de Salud Pública Provincia de Santa Fe, <sup>3</sup>Hospital de Niños Alassia - Ministerio de Salud Pública Provincia de Santa Fe, <sup>4</sup>Hospital de Niños V J Vilela - Secretaria de Salud Pública – Municipalidad de Rosario, <sup>5</sup>Laboratorio de Pesquisa Neonatal - Ministerio de Salud Pública Provincia de Santa Fe, <sup>6</sup>Biología Molecular- Genética, Hospital Garrahan, Buenos Aires.  
e-mail: ms.benetti@hotmail.com

Introducción: El diagnóstico de Fibrosis Quística (FQ) se basa en criterios clínicos y métodos de laboratorio. Un diagnóstico temprano permite proveer tratamiento adecuado mejorando la calidad de vida, como así también brindar asesoramiento genético a la familia. La incorporación de FQ al panel de enfermedades a pesquisar ha sido de utilidad para disminuir su subdiagnóstico. Objetivo: Evaluar la aplicación de algoritmo para diagnóstico temprano de FQ a partir de resultados elevados de tripsina inmunorreactiva (TIR) en la pesquisa neonatal (PN). Método: El algoritmo surge del consenso colaborativo e interdisciplinario entre los servicios de la Red de PN de Santa Fe y el Servicio de Genética del H. Garrahan. El mismo consiste en realizar simultáneamente *Test del sudor (TS)* y *detección 32 mutaciones del gen CFTR (ADN)* a aquellos pacientes con 2 TIR elevadas o con 1 TIR elevada sin llegar a tiempo para segunda TIR. Los métodos utilizados fueron: Elisa para TIR, Gibson y Cooke para TS y OLA Cystic Fibrosis Assay para ADN. Definición de caso de FQ: detección 2 mutaciones y/ó 2 TS positivos. Desde abril de 2013 a mayo de 2014 se realizaron 37464 estudios de PN de los cuales 32 pasaron a TS y ADN. Resultados: De los 32 pacientes estudiados se diagnosticaron 7(21,9%) para FQ. De éstos, a 5 se les detectó 2 mutaciones y tuvieron 2 TS positivos, y a 2 pacientes se les detectó 1 mutación y tuvieron 2 TS positivos. Conclusión: Este algoritmo permitió disminuir el tiempo de diagnóstico en aquellos pacientes que surgen de PN y asegurar así el acceso inmediato a servicios especializados.

## FIBROSIS QUÍSTICA. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 381 PACIENTES Y FAMILIARES ARGENTINOS

Oller Ramírez AM<sup>1</sup>, M Melano de Botelli<sup>2</sup>, J Mugnaini<sup>1</sup>, N Guelbert<sup>1</sup>, R Dodelson de Kremer<sup>1</sup>. <sup>1</sup>CEMECO, Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad Cs Médicas, UNC, Hospital de Niños, Córdoba, Argentina. <sup>2</sup>Fundación para el Bienestar del Niño, Programa de Asistencia a la Fibrosis Quística.

e-mail: ramirezoller@gmail.com

**Introducción:** La Fibrosis Quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen Regulador de conductancia Transmembrana (CFTR). Se han identificado más de 1900 variaciones ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)). **Objetivos:** 1) Establecer el espectro y frecuencia de mutaciones en el gen CFTR en pacientes FQ argentinos 2) Analizar pacientes con Diagnóstico Tardío y Fenotipos Relacionados a FQ. 3) Detectar portadores. **Pacientes:** Se definieron por clínica y 2 pruebas del sudor positivos a 138 pacientes, 8 por análisis molecular. Total: 146 FQ. Se analizó a 235 familiares. **Métodos:** Se realizó pesquisa completa de 27 exones del gen CFTR por técnicas de rastreo de alta sensibilidad. **Resultados:** Se identificaron en total 38 mutaciones (10 con porcentaje mayor al 1%). Se detectó 87.4 % de alelos mutados. Se clasificó a 22 personas según los valores de cloruros en sudor, en Valores Positivos (60 mmol/L ó >), Valores Intermedios (40-59 mmol/L) y Valores Normales (<40 mmol/L). Se detectaron 8 mutaciones leves. De las 235 personas estudiadas se detectaron 156 portadores. **Conclusiones:** Los valores positivos de cloruros en sudor confirman la enfermedad de FQ. La identificación de mutaciones leves en los 3 grupos explicaría el diagnóstico FQ tardío. Reconocer 2 mutaciones en personas con fenotipos atípicos (valores de sudor intermedios ó normales) reafirma la importancia de los análisis moleculares como herramienta diagnóstica. También esta información es crucial para el asesoramiento genético y para la aplicación de terapias moleculares específicas. **Subsidios:** Programa de Asistencia a la FQ, SECYT, PICT 2010

## ANALYSIS OF MICRORNA AND GENE EXPRESSION PROFILE IN DOWN SYNDROME CHILDREN

Zampieri BL<sup>1</sup>, JM Biselli-Périco<sup>2</sup>, MC Bürger<sup>3</sup>, JES Souza<sup>4</sup>, WA Silva<sup>5</sup>, EN Ferreira<sup>6</sup>, DM Carraro<sup>6</sup>, EM Goloni-Bertollo<sup>1</sup>, EC Pavarino<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, <sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" - UNESP, <sup>3</sup>Laboratório de Bioinformática, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP, Universidade de São Paulo - USP, <sup>4</sup>Instituto de Bioinformática e Biotecnologia, <sup>5</sup>Bio: Laboratório de Bioinformática, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto - FUNDHERP, <sup>6</sup>Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP, Universidade de São Paulo - USP, <sup>6</sup>Hospital A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente - FAP, Centro Internacional de Ensino & Pesquisa.

e-mail: erika@famerp.br

Down syndrome (DS) has been associated with altered gene and microRNAs (miRNAs) expression. The expression of immune-related genes and miRNAs in DS children and a possible association between the differentially expressed genes and miRNAs were investigated. Peripheral blood mononuclear cells samples were obtained from six DS individuals and six healthy controls (ages 2-6 years). The expression of 754 mature miRNAs and 92 immune-related genes were investigated using real-time PCR arrays. All expression analyses were performed using packages available under Bioconductor project. Target prediction was performed using the software DIANA-microT-CDS 5.0. Two miRNAs (hsa-miR-452-5p and hsa-miR-668) were down-regulated and four (hsa-miR-hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-130b-5p, hsa-miR-942 and hsa-miR-424-3p) were up-regulated and 13 genes (*BCL2*, *CCL3*, *CCR7*, *CD19*, *CD28*, *CD40*, *CD40LG*, *CD80*, *EDN1*, *IKBKB*, *IL6*, *NOS2* and *SKI*) were down-regulated and four genes (*BCL2L1*, *CCR2*, *CCR5* and *IL10*) up-regulated in children with DS. miRNAs located on chromosome 21 did not present differential expression between the groups. The target prediction analysis of the differentially expressed miRNAs revealed association between them and the differentially expressed genes involved in the immune system observed. The miRNA has-miR.378a-3p presented two target genes (*BCL2* and *CCR7*) that are consistent with the miRNA-target gene expression pattern. We conclude that DS children present miRNA and immune-related genes differentially expressed that are possibly associated. Support: FAPESP, CAPES, CNPq, FAMERP/FUNFARME.

GGM 41

## ANOMALÍAS SUBTELOMÉRICAS EN PACIENTES CON DISCAPACIDAD INTELECTUAL

Espeche L<sup>1</sup>, A Solari<sup>1</sup>, E Furforo<sup>1</sup>, P Brun<sup>1</sup>, C Sargiotto<sup>1</sup>, M Pérez<sup>1</sup>, C Montes<sup>2</sup>, R Armando<sup>3</sup>, F Villegas<sup>3</sup>, S Rozental<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro Nacional de Genética Médica- ANLIS, <sup>2</sup>División Genética Médica Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba, <sup>3</sup>Sección de Genética, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez.

e-mail: lespeche@yahoo.com.ar

La discapacidad intelectual (DI) afecta al 1-3% de la población. La determinación de la etiología es compleja y se estima que en un 50% de los pacientes no se puede establecer el diagnóstico y ofrecer un asesoramiento genético certero. En los últimos años se evidenció la importancia de las anomalías subteloméricas (AS) como causa de esta condición. Las técnicas de FISH y MLPA permiten revelar estas anomalías crípticas en aproximadamente el 5% de los pacientes con DI. El objetivo fue identificar AS en una muestra de 75 pacientes con DI y dismorfias y analizar la correlación entre los hallazgos y el fenotipo. Se utilizaron los kits comerciales de MLPA P036 y P070. En todos los casos se descartaron anomalías cromosómicas, exposición prenatal a teratógenos y causas sindrómicas o perinatales. En los casos positivos se realizó la confirmación por FISH y/o MLPA de seguimiento. Se analizaron las características clínicas empleadas en la literatura como criterios de inclusión y el fenotipo de los casos positivos. Se detectaron AS en 6/75 (8%) pacientes: deleciones en 1p (3 casos), en 4p, en 11q y una duplicación en 3p. No se observó relación entre la severidad de la DI o anomalías del crecimiento y el hallazgo de AS. La incorporación de la técnica de MLPA al protocolo de estudio de pacientes con DI permite optimizar el diagnóstico y asesoramiento genético. La presencia de dismorfias asociadas a DI sería el principal criterio de sospecha para las AS. Nuestros resultados aportan evidencias para avanzar en la descripción del cuadro clínico asociado a los desbalances detectados.