

LABORATORIO DE ALTO RENDIMIENTO PARA SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

F. Javier Chaves Martínez
Laboratorio de Estudios Genéticos,
Fundación de Investigación del Hospital Clínico
Universitario de Valencia.

Técnicas

Secuenciación

Identificación y análisis de polimorfismos

PCR cuantitativo a tiempo real

Equipamiento

Secuenciador de gran capacidad

Sistemas automáticos de manejo de líquidos

Termocicladores de alta capacidad

LightTyper

PCR cuantitativo (Roche)

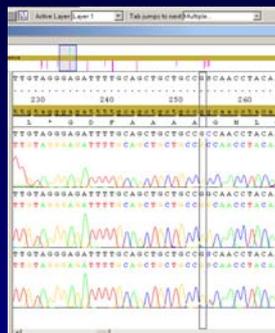
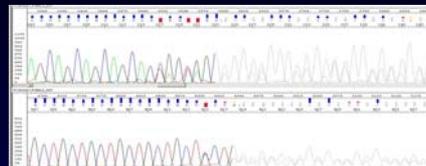
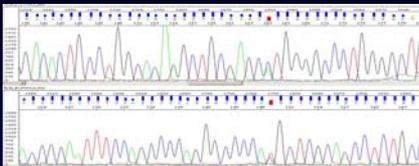
LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS: USO DE SISTEMAS DE ALTO RENDIMIENTO

SECUENCIACIÓN

Identificación y análisis de polimorfismos

RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN

Capacidad de preparación y análisis de unas 1000 secuenciaciones al día



LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

APLICACIONES:

Identificación de mutaciones/polimorfismos.

Estudio de genes candidatos a causar enfermedades.

Estudio de genes que puedan estar implicados en enfermedades multifactoriales.

Caracterización de mutaciones:

Estudio de alteraciones de I/D, grandes reordenamientos, etc.
Caracterización de cDNAs, etc.

LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS: USO DE SISTEMAS DE ALTO RENDIMIENTO

Secuenciación

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

PCR cuantitativo a tiempo real

LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

Polimorfismos que suponen la I/D de bases:

- Análisis de fragmentos
- SNPlex (I/D de 6 bp)

Análisis de SNPs:

- LightTyper
- SNAPShot
- SNPlex

ANÁLISIS DE FRAGMENTOS

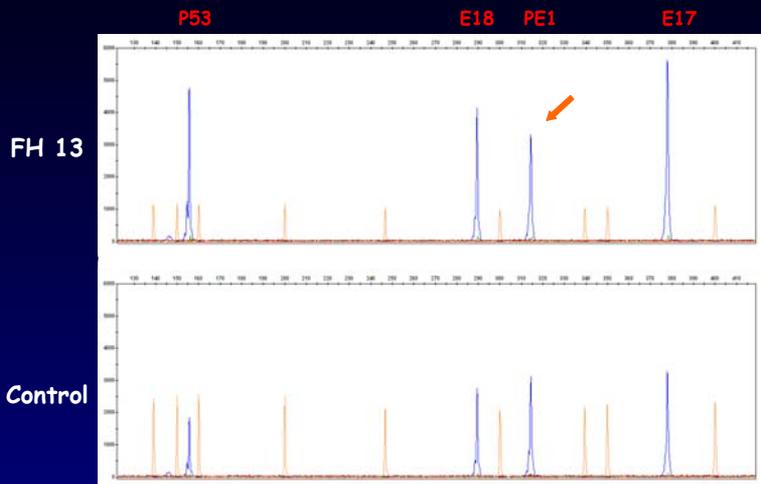
ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

- Detección de grandes reordenamientos.
- Determinación de polimorfismos de I/D de grandes secuencias (exones o genes completos como en GSTT1 y GSTM1).

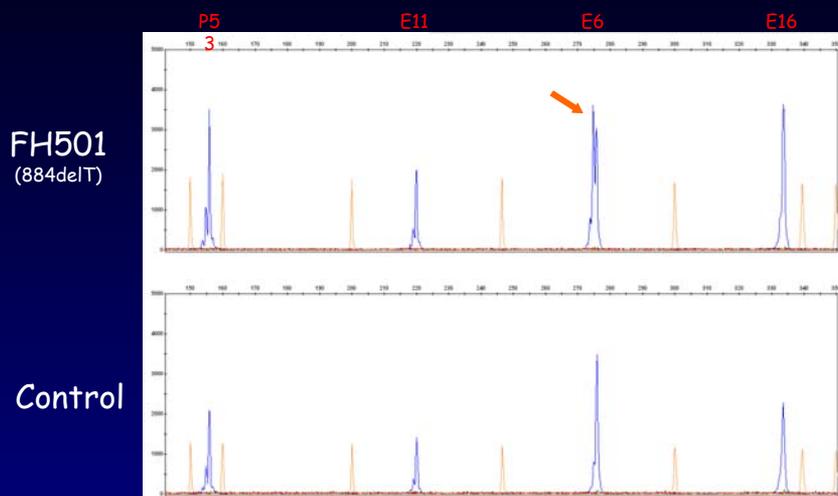
ANÁLISIS DE TAMAÑOS

- Detección de pequeñas alteraciones.
- Estudio de I/D, STRs y VNTRs.

GRANDES ALTERACIONES DE LA SECUENCIA



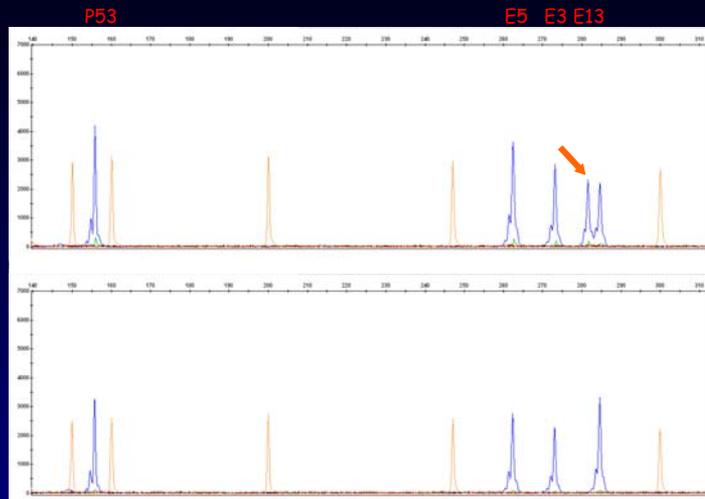
PEQUEÑAS INSERCIONES O DELECCIONES



PEQUEÑAS INSERCIONES O DELECCIONES

FH218
(del 7pb E13)

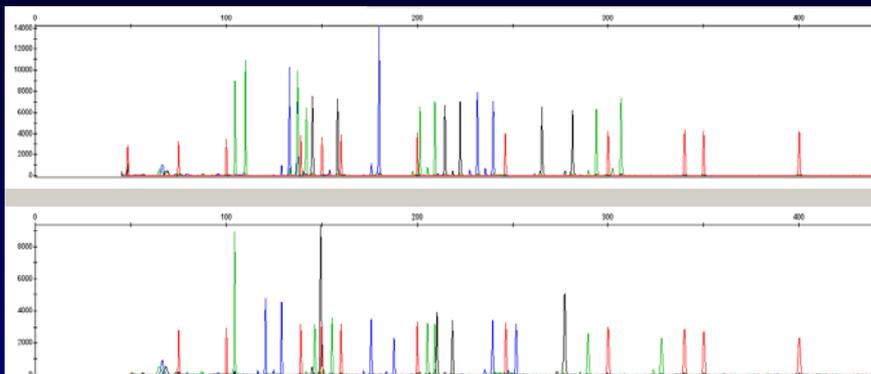
Control



LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

ANÁLISIS DE STRs:

Estudios de asociación
Pérdida de heterocigosidad
Inestabilidad



Análisis de SNPs

- LIGHTTYPER

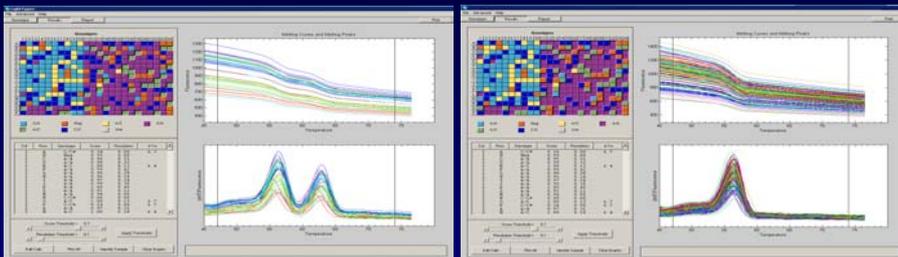
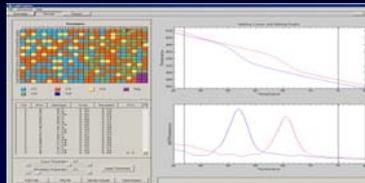
- SNAPShot

- SNIPlex

LIGHTTYPER

Detección de un SNP en unos 20 minutos (en 384 muestras).

Utilización de sondas específicas para uno de los alelos y realización de curvas de disociación



Permite obtener unos 10000 datos de SNPs al día

SNAPSHOT

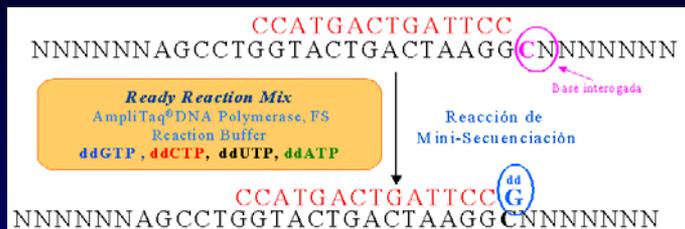
AMPLIFICACIÓN POR PCR



PURIFICACIÓN



MINISECUENCIACIÓN

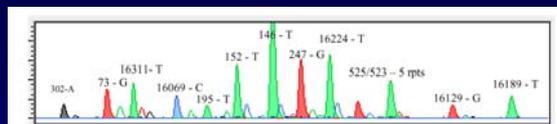
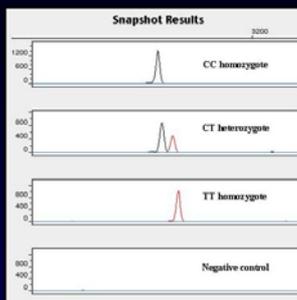


PURIFICACIÓN



ELECTROFORESIS

SNAPSHOT

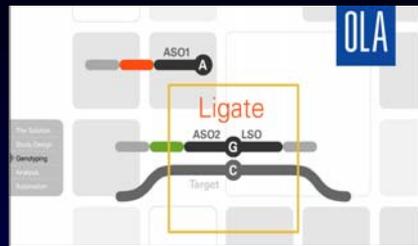


Permite obtener mas de 15000 datos de SNPs al día

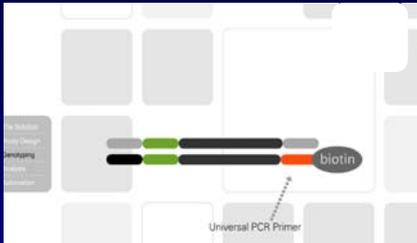
SNPLEX



AMPLIFICACIÓN



HIBRIDACIÓN



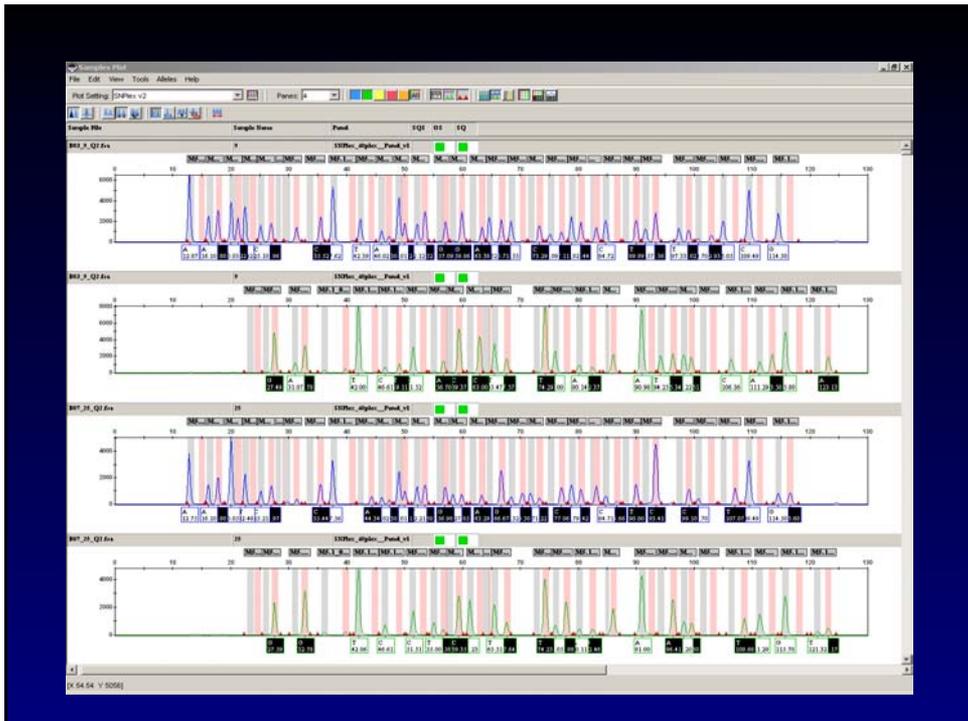
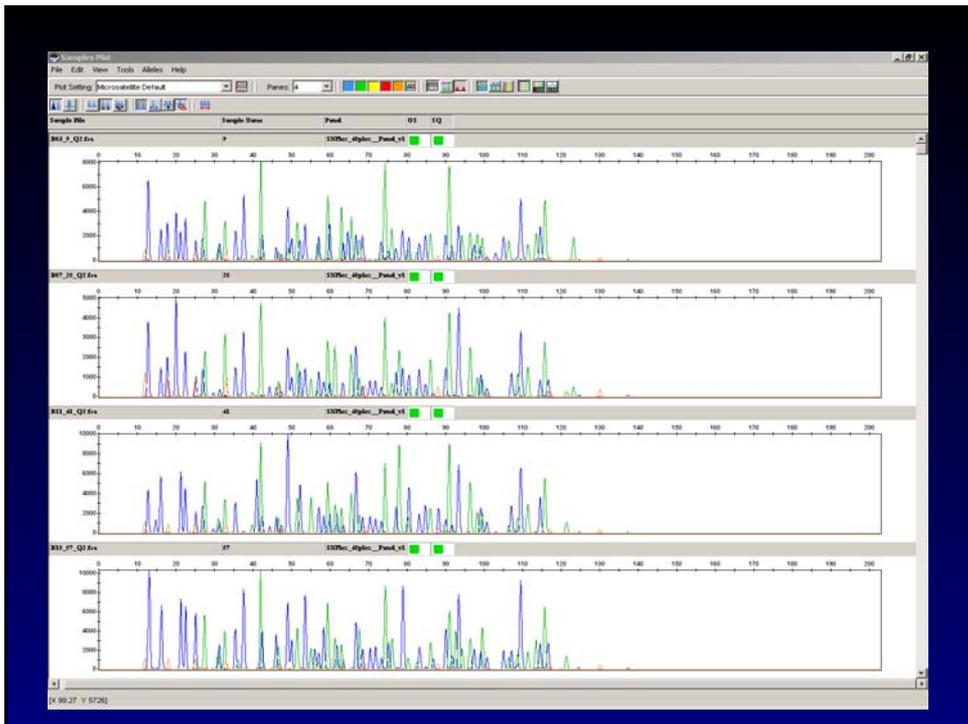
PURIFICACIÓN



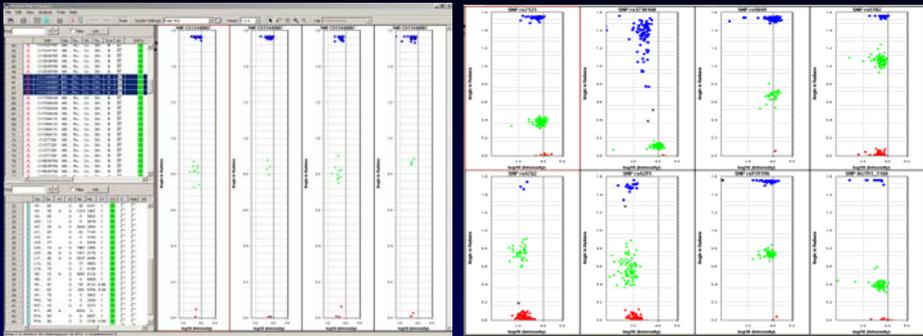
ELECTROFORESIS



detection



SNPLEX

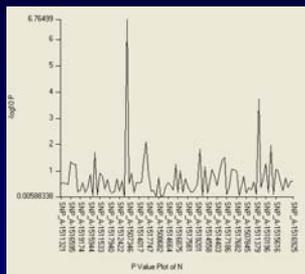


Permite obtener hasta 10000 datos de polimorfismos al día

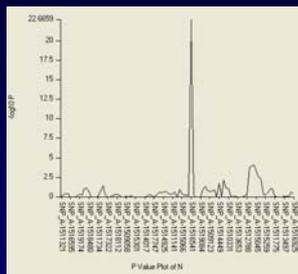
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

Estudios en daño renal en hipertensos: localización de una región cromosómica de unas 1000 kb posiblemente relacionada con el desarrollo de daño renal.

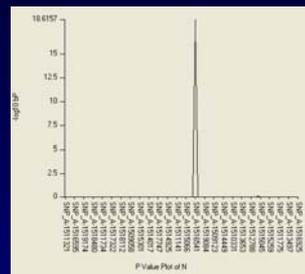
INDIVIDUALMENTE
(ρ)



HAPLOTIPOS
(ρ)



HAPLOTIPOS
(Bonferroni p)



LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS:

Estudio de genes candidatos que puedan estar implicados en enfermedades mono/oligogenéticas y/o multifactoriales.

Identificación de regiones cromosómicas y, posteriormente, de genes relacionados con enfermedades mono/oligogenéticas y/o multifactoriales.

CONCLUSIÓN

DISPONEMOS Y DISPONEIS DE UN LABORATORIO DE ANÁLISIS GENÉTICOS QUE NOS PUEDE FACILITAR LA VIDA EN ESTE TIPO DE TRABAJOS.

GRUPOS DE TRABAJO

Estudios Genéticos

F. Javier Chaves Martínez
Sebastián Blesa Lujan
Ana B. García García
M^a Luisa Mansego Talavera
Verónica González Albert

Servicio de Endocrinología

Rafael Carmena
Juan F. Ascaso
José T. Real
Sergio Martínez Hervás

Redes Cooperativas de Investigación

Servicio de Medicina Interna

Josep Redón Mas
Jose V Lozano Vidal

Hospital Rio Hortega (Valladolid)

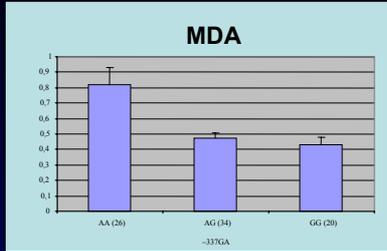
Juan C. Martín Escudero

Conselleria de Sanidad

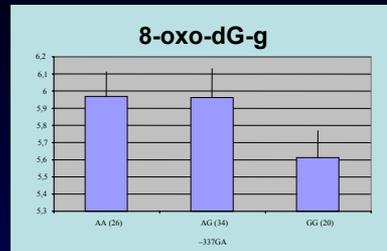
Rosa Marín



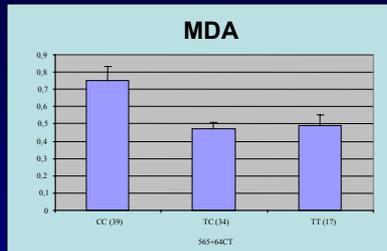
ASOCIACIÓN XO CON NIVELES DE EO



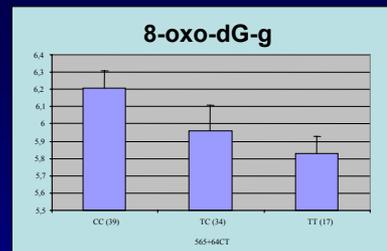
p=0.01



p=0.23



p=0.02



p=0.04

CONCLUSIONES

Variaciones de la xantina oxidasa modulan los niveles de presión arterial y los niveles de EO.

PRÓXIMOS ESTUDIOS

Análisis de 5 genes en unos 40 pacientes HF para identificar mutaciones en genes candidatos.

Diagnostico genético de unas 100 muestras (principalmente HF).

Estudio de unos 5-10 genes para identificar nuevos polimorfismos relacionados con HTA.

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN.

- Reacciones de secuenciación y electroforesis.
- Diseño y realización de estudios de secuenciación de genes, sistemas genéticos, ARNs o genomas.

PRÓXIMOS ESTUDIOS

- Análisis de unos 200 polimorfismos en unas 5000 muestras.

- Acotamiento de regiones cromosómicas identificadas mediante búsqueda genómica mediante microchips de SNPs (10K-Affimetrix) para la identificación de genes causantes de daño renal.

SERVICIO DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

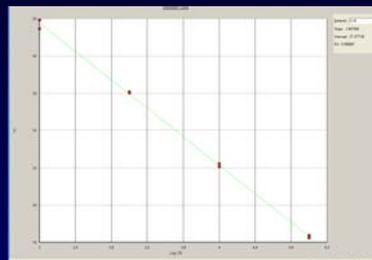
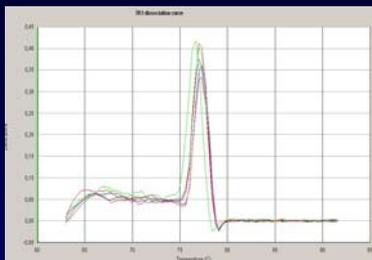
- Electroforesis de muestras.
- Realización de reacciones y electroforesis.
- Diseño y realización de estudios de polimorfismos.
- Análisis estadístico de los resultados.

LABORATORIO DE ESTUDIOS GENÉTICOS

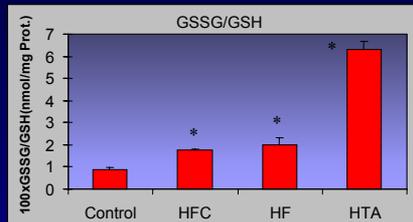
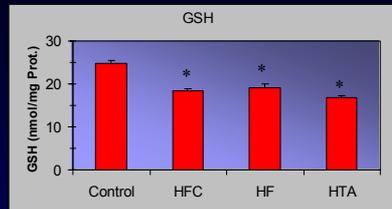
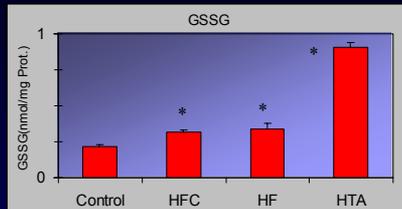
Desarrollo de un laboratorio con sistemas de alto rendimiento para la realización de:

Secuenciación
Identificación y Análisis de polimorfismos
PCR cuantitativo a tiempo real

PCR CUANTITATIVO A TIEMPO REAL

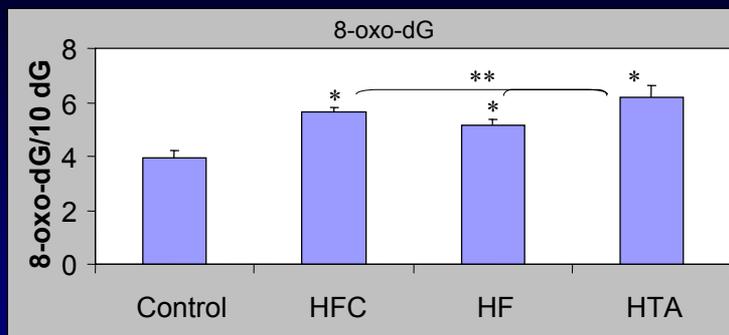


ESTUDIO DEL EO EN PACIENTES CON ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR



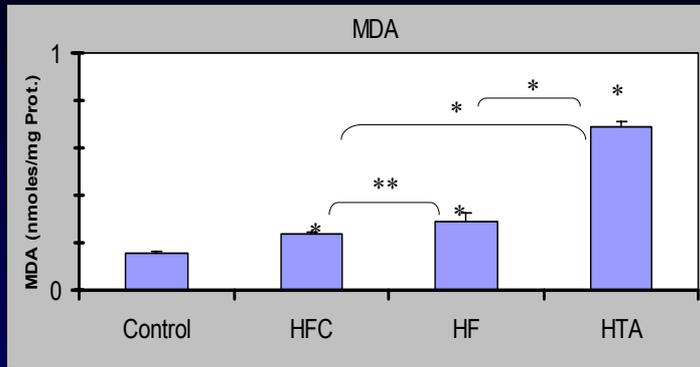
*: P<0.001

NIVELES DE 8-oxo-dG EN ADN GENÓMICO



*: P<0.001
**: p<0.01

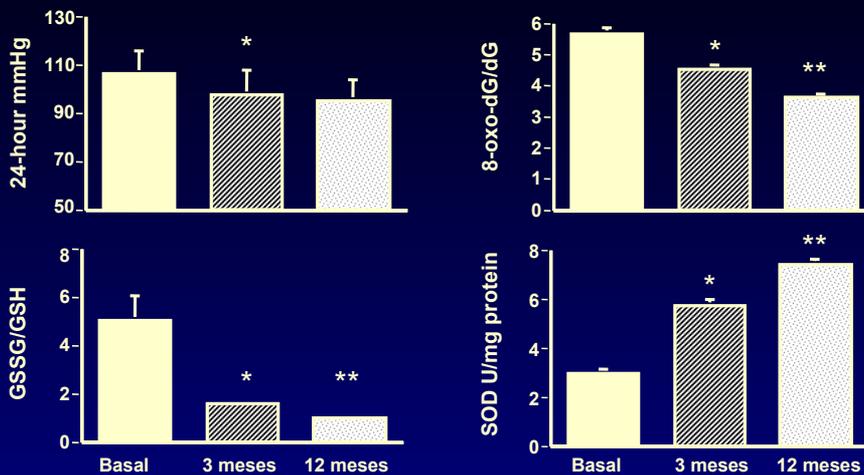
NIVELES DE MDA EN LINFOCITOS



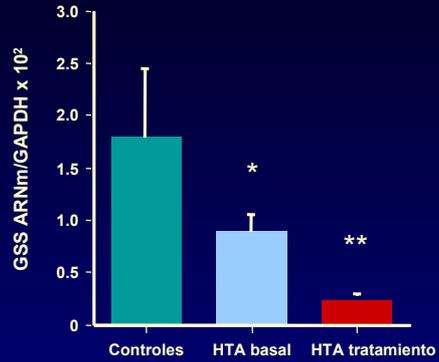
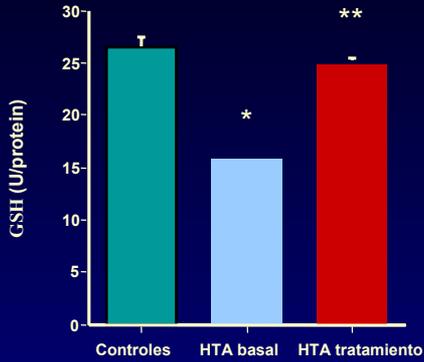
*: $p < 0.0001$

** : $p < 0.05$

DURACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIHIPERTENSIVO Y NIVELES DE EO

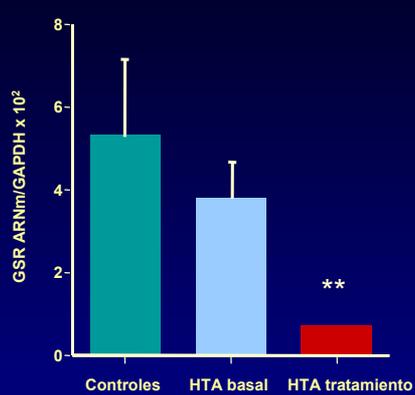
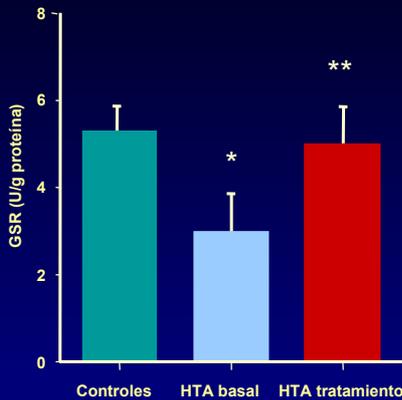


NIVELES DE GSH NIVELES DE ARNm DE GSS



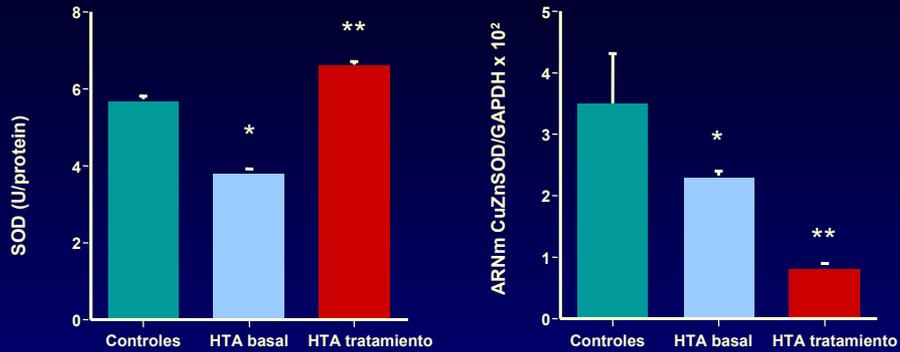
* p<0.001 al comparar entre controles y pacientes sin tratar.
** p<0.001 al comparar entre pacientes sin tratar y tratados.

ACTIVIDAD GSR NIVELES DE ARNm DE GSR



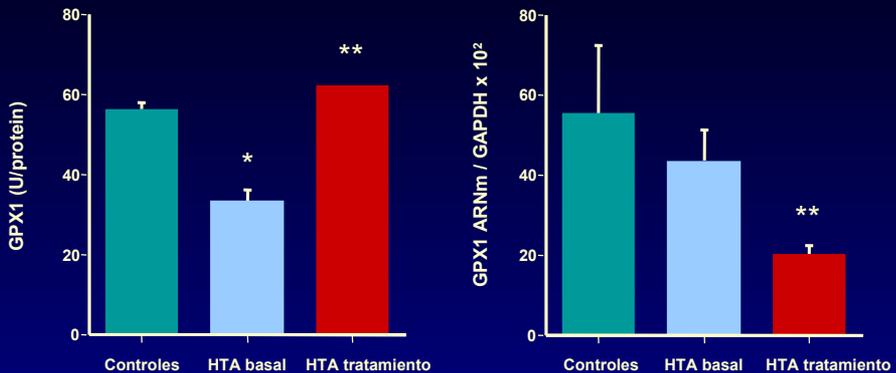
* p<0.001 al comparar entre controles y pacientes sin tratar.
** p<0.001 al comparar entre pacientes sin tratar y tratados.

ACTIVIDAD DE LA Cu/ZnSOD NIVELES DE ARNm

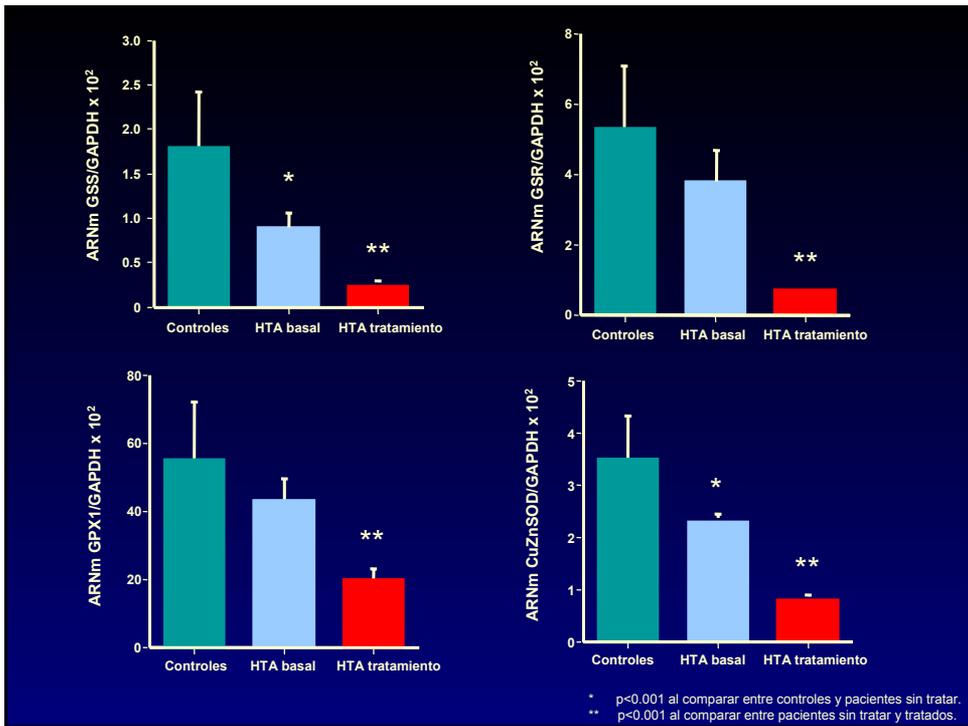


* p<0.001 al comparar entre controles y pacientes sin tratar.
** p<0.001 al comparar entre pacientes sin tratar y tratados.

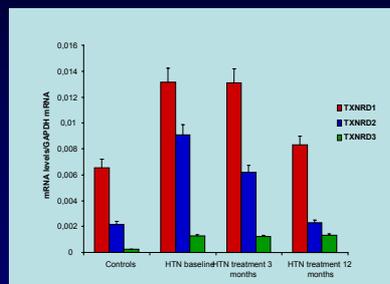
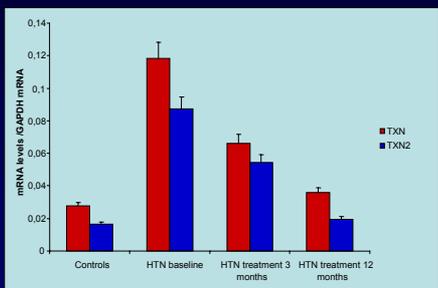
ACTIVIDAD DE LA GPX INTRACELULAR NIVELES DE ARNm DE GPX1



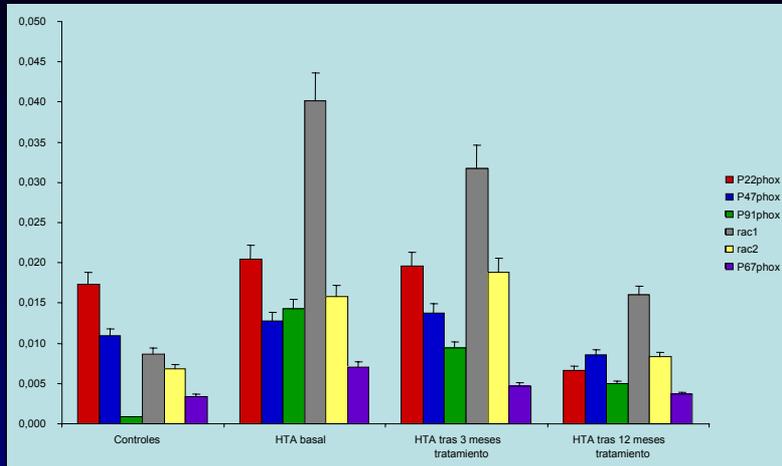
* p<0.001 al comparar entre controles y pacientes sin tratar.
** p<0.001 al comparar entre pacientes sin tratar y tratados.



SISTEMA TIOREDOXINA



Niveles de ARNm NADP(H) OXIDASA en Controles, Hipertensos e Hipertensos tratados



CONCLUSIONES

Existe una alteración de los niveles de expresión de los genes protectores frente a EO que ocasiona parte del incremento de los niveles de EO en células circulantes en HTA y en otras enfermedades con alto riesgo cardiovascular.



NIVELES DE ARNm DE GENES PROTECTORES FRENTE A EO EN PACIENTES CON ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR

