

Identificación y evaluación de genes de enzimas antioxidantes y genes de referencia para RT-PCR en sangre de *Caiman latirostris*

ODETTI, Lucia M^{1,2*}; PARAVANI, Enrique V³; SIMONIELLO, Ma. Fernanda¹; POLETTA, Gisela Laura^{1,2,4}



¹Cát. de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, UNL- FBCB; ²CONICET; ³Lab. de Química Ambiental, Cát. de Qca. General e Inorgánica. FIUNER; ⁴Proyecto Yacaré.

luodetti@gmail.com

XXXVII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología – I Jornada Virtual Iberoamericana de Toxicología

INTRODUCCIÓN

Los biomarcadores utilizados hasta el momento para identificar el impacto de los plaguicidas en *C. latirostris* incluyen marcadores de daño al ADN, daño oxidativo al ADN y lípidos, enzimas antioxidantes y alteraciones inmunológicas. La posibilidad de aplicar marcadores de expresión génica en esta especie permitirá comprender el significado específico de muchas alteraciones inducidas por plaguicidas y observadas a través de los marcadores antes mencionados. A su vez, la evaluación y validación de genes de referencia en cocodrilos es limitada y la mayoría de los estudios de expresión han utilizado un solo gen de referencia sin evaluar la estabilidad de los mismos.

OBJETIVOS

- ✓ Evaluar los niveles de transcripción de los genes catalasa (*cat*) y superóxido dismutasa (*sod*) en sangre de *C. latirostris*, para proponerlos como biomarcadores del estrés oxidativo inducido por estresores ambientales.
- ✓ Evaluar la estabilidad de los genes β -actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) y proteína ribosomal L8 (*rpl8*) para ser utilizados como genes de referencia, a través de diferentes métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1 Extracción de ARN, determinación de calidad y síntesis de ADNc
- 2 Selección de genes y diseño de primers
- 3 Determinación de la estabilidad de genes de referencia

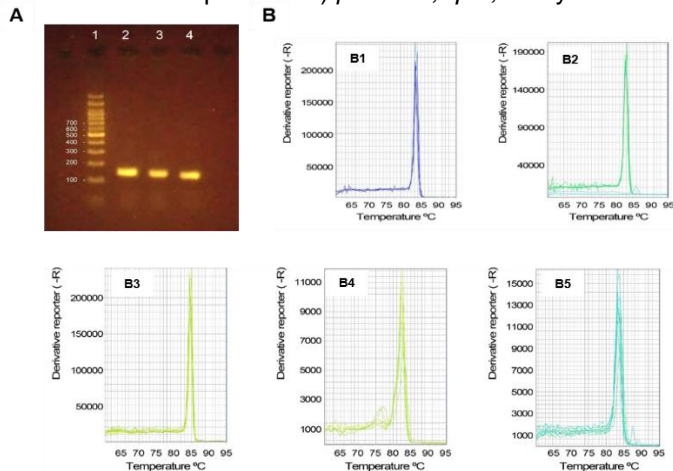
Abreviación	Forward (F) y Reverse (R) Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicon (pb)
<i>β-actin</i>	F: TCACGAGACCACTTTCAACTC R: AGGGCTGTGATTTCCCTCTG	138
<i>gapdh</i>	F: GGCTGAGAATGGAAAACCTGTG R: TCCCACTTGATGTTGCTG	82
<i>rpl8</i>	F: CCAGAAGGCACCACTTTGTTG R: ATAGTTTCAGAAACACGGG	78
<i>sod</i>	F: GATGAGAGGCATGTTGGAG R: CCACCATGGTACGTCCA	124
<i>cat</i>	F: TGAGCCTAGCCCTGATAAAATG R: CTCTGATAGTTAGCGACACGAG	135

- ✓ Métodos: comparativo Δ Ct, NormFinder, geNorm, BestKeeper y RefFinder.

RESULTADOS

1 Identificación de genes, caracterización de los primers diseñados y eficiencia de las reacciones de PCR

- ✓ El porcentaje de eficiencia osciló entre el 96% y el 110%.
- ✓ Perfiles de expresión: 1) *β -actina*, *rpl8*, *sod* y *cat* en nivel medio y 2) *gapdh* en nivel bajo de expresión.

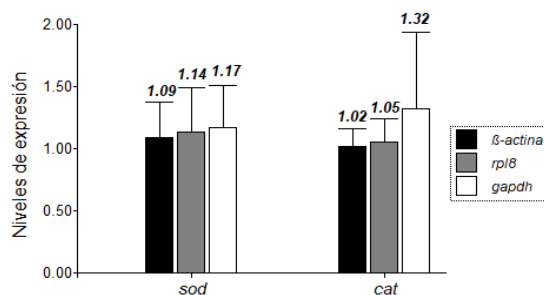


A) Gel de agarosa (2%) que muestra los productos de PCR específicos para cada gen. Calle 1: marcador de peso molecular de 100 pb; calle 2: *β -actina* - 138 pb; calle 3: *cat* - 135 pb; calle 4: *sod* - 124 pb. **B)** Curvas de fusión generadas para todos los genes. B1: *cat*; B2: *sod*; B3: *β -actina*; B4: *gapdh*; B5: *rpl8*.

2 Determinación de la estabilidad de genes de referencia

Genes de referencia	Δ Ct	NormFinder	BestKeeper	geNorm
	Media DS	Ind. Estabil.	DS	M value
<i>β-actina</i>	0,69	0,201	0,204	0,58
<i>rpl8</i>	0,91	0,544	0,661	0,58
<i>gapdh</i>	1,021	0,666	0,442	0,874

3 Expresión de *cat* y *sod* usando los tres genes de referencia



CONCLUSIÓN

Los niveles de expresión de *cat* y *sod*, junto con los demás biomarcadores de estrés oxidativo aplicados de forma rutinaria por nuestro grupo en *C. latirostris*, permitirán analizar, de forma integrada, la respuesta inducida en estos animales por diferentes xenobióticos. Además, este estudio proporciona metodologías adecuadas en cocodrilos para la selección, estabilización y normalización de genes de referencia para obtener datos precisos en el análisis de la expresión de genes diana con PCR en tiempo real.