



V-206. - VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA ENDÓGENOS PARA QRT-PCR EN MUESTRAS HUMANAS DE TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y PERIFÉRICO PARA ESTUDIO EN PACIENTES CON OBESIDAD

R. Macías¹, J. Torres¹, L. Manzanedo¹, A. Mateos¹, L. Hernández², O. Rozo², R. González³, M. Marcos¹

¹Servicio de Medicina Interna, ²Cirugía General. Hospital Universitario de Salamanca. Hospital Clínico. Salamanca. ³Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca.

Resumen

Objetivos: La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) es el método estándar para el estudio de los cambios relativos de expresión génica de ARN mensajero (ARNm) en diferentes tejidos y/o condiciones experimentales. Esta técnica requiere de estrategias de normalización de datos, de las que la más utilizada es el uso de genes de referencia como control interno. Un gen de referencia ideal es aquel que expresa una cantidad de ARNm de forma consistente en todas las muestras bajo estudio, independientemente del tipo de tejido o condiciones experimentales. El objetivo de nuestro estudio fue validar genes de referencia candidatos en muestras humanas de tejido adiposo visceral y periférico de pacientes con obesidad y en controles sanos para el análisis mediante PCR.

Métodos: Las muestras de tejido adiposo visceral y periférico fueron obtenidas de pacientes con obesidad mórbida que fueron sometidos a cirugía bariátrica electiva y controles sanos sin obesidad, a los que se les realizó una colecistectomía laparoscópica electiva. Todos ellos fueron intervenidos en el servicio de Cirugía General del Hospital Universitario de Salamanca. Se seleccionaron los genes de la actina, 36B4, GAPDH y POLR2A como posibles genes de referencia por haber sido utilizados previamente con este fin en tejido adiposo. La expresión de ARNm fue examinada mediante el análisis de PCR cuantitativa usando el equipo de PCR a tiempo real Step-One-Plus de Applied Biosystems. La estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos se evaluó usando los algoritmos estadísticos GeNorm y NormFinder incorporados en el programa Genex y la plantilla de Excel del algoritmo BestKeeper.

Resultados: Se analizaron los niveles de expresión de ARN en 10 pacientes y en 10 controles. El análisis de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos evidenció que actina y GAPDH fueron los genes de referencia más estables en grasa periférica y actina y 36B4 en grasa visceral.

Discusión: El análisis mediante qRT-PCR de la expresión génica relativa requiere de una adecuada estrategia de normalización dado que el uso de genes de referencia inadecuados puede llevar a errores en los resultados. Diferentes estudios han demostrado variaciones en la expresión de genes de referencia en muestras de tejido adiposo de pacientes con obesidad, por lo que se hace necesario el uso de estrategias de validación para mejorar la sensibilidad de los resultados de la qRT-PCR.

Nuestros resultados demuestran que actina es un gen de referencia estable en muestras de tejido adiposo visceral y periférico.



Conclusiones: La actina es un gen de referencia estable y adecuado para los estudios de expresión génica de tejido adiposo visceral y periférico.