



V-213 - VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA ENDÓGENOS PARA QRT-PCR EN MUESTRAS HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA PARA ESTUDIO EN PACIENTES CON CONSUMO INTENSIVO DE ALCOHOL

L. Pinzón Uribe¹, J. Torres Triana¹, P. Costa Alba², R. Macías Casanova¹, M. Pérez Nieto³, R. González-Sarmiento³, M. Marcos Martín¹, J. Laso Guzmán¹

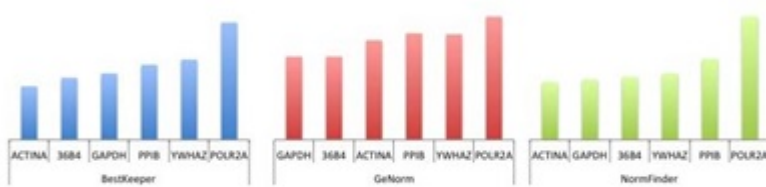
¹Servicio de Medicina Interna. ²Servicio de Urgencias. Hospital Universitario de Salamanca. Hospital Clínico. Salamanca. ³Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca.

Resumen

Objetivos: El consumo de una gran cantidad de etanol en un corto periodo de tiempo (binge drinking o consumo intensivo) provoca daño orgánico (como hepatopatía, neuroinflamación o pérdida neuronal) en buena parte por la inducción de una respuesta inflamatoria. Sin embargo, no están esclarecidos los mecanismos que regulan la respuesta inflamatoria tras el consumo agudo de alcohol. Este desconocimiento contribuye a la ausencia de terapias para el daño asociado al consumo intensivo de alcohol. 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 sangre periférica de pacientes con consumo intensivo de alcohol y en controles sanos para el análisis mediante PCR.

Métodos: Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de pacientes con intoxicación alcohólica y de controles sanos con una ingesta menor de 10 g/día de alcohol. Se seleccionaron los genes de la actina, 36B4, GAPDH, PPIB X2, YWHAZ y POLR2A como posibles genes de referencia por haber sido utilizados previamente con este fin en diferentes tejidos. 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 y 36B4 fueron los genes de referencia más estables en las muestra de sangre periférica de pacientes con consumo intensivo de alcohol y controles.



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 relación con el tipo de muestras y las condiciones experimentales, 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 sangre periférica de pacientes con consumo intensivo de alcohol.