Microarreglos de ADN y sus aplicaciones en investigaciones biomédicas

Carlos Vallin Plous

Laboratorio de Genética, Centro de Química Farmacéutica, Avenida 21 y Calle 200, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Código Postal 11600, Cuba. Correo electrónico: val@infomed.sld.cu

Recibido: 20 de enero de 2006. Aceptado: 24 de marzo de 2007.

Palabras clave: microarreglo de ADN, genes, hibridización, expresión.
Key words: DNA arrays, genes, hybridization, expression.

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo consiste en realizar una actualización de los últimos desarrollos llevados a cabo en la tecnología relacionada con los microarreglos de ADN y su aplicación en la medicina. Los microarreglos de ADN surgen de la necesidad de analizar la cantidad de información procedente de los grandes proyectos de secuenciación de genomas. Los "chips" o microarreglos de ADN son una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. El ácido nucleico diana que será detectado puede ser ADN o ARN y previamente a la hibridación debe ser marcado con una sustancia fluorescente o radiactiva. La principal ventaja con respecto a las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa es que pueden detectarse en un único procesamiento miles de genes. Sus aplicaciones clínicas están en fase de desarrollo. Sin embargo, cabe especular con algunas posibles aplicaciones futuras. Por ejemplo, Cáncer, Alergia, Inmunodeficiencias primarias, Enfermedades autoinmunes y Enfermedades infecciosas. La posibilidad de poder medir simultáneamente la expresión de todos los genes de un genoma, o al menos de una parte considerable de este, abre un abanico de nuevas posibilidades muchas de las cuales aún están por explorar.

ABSTRACT. The aim of the current work has been to do an updated review of the last years in the development carried out in the technology of the DNA arrays and their application in medical research. The DNA arrays emerge because the necessary of analyzes the quantities information from the projects of the genomics sequences. The DNA arrays or microchips are sets of DNA probes bound to a solid support in a prefixed and regular disposition. The target nucleic acid that can be detected is either DNA or RNA, which is previously labeled with a fluorochrome or a radioactive compound. The main advantage with regards to other molecular biological tools, such as polymerase chain reaction, is that thousands of genes can be detected in a single procedure. The applications of the DNA arrays in the clinical field are in the phase of research and development. However we can see some possible applications in the future. For example: cancer, allergy, primary immunodeficiencies, autoimmune diseases and Infections diseases. The possibilities of measuring simultaneously the expression of all genes in the genome or at least great part of this, opens new possibilities, however, many of them are still unexplored.

INTRODUCCION

Un *microarreglo de ADN* (también denominado *DNA chip*, *oligonucleotide DNA chip* o *gene chip*) consiste en múltiples fragmentos de ADN complementario (cada uno de los cuales representa un gen diferente) adheridos a un soporte físico concreto (vidrio, plástico, silicona, etc.) y agrupados de manera ordenada (filas y columnas) según su función (receptores, hormonas, factores de transcripción, citocinas, etc.). Los *microarreglos de ADN* hoy en uso incluyen entre 9 000 y 40 000 fragmentos de ADNc (genes) por cm^2. Por tanto, disponen virtualmente de la expresión de todo el genoma en estudio.[1-2]

Utilidad de un microarreglo de ADN

Un *microarreglo de ADN* sirve para determinar la expresión genética completa de un tejido en un momento determinado. Esta "foto genética transversal" de un tejido concreto se denomina "transcriptoma". El transcriptoma, al contrario que el genoma (conjunto de todos los genes existentes en una célula), cambia continuamente en respuesta a cambios en las condiciones microambientales celulares o tisulares (temperatura, pH, PO_2, citocinas, hormonas, etc.). Por tanto, la interpretación del transcriptoma objeto de estudio requiere necesariamente de su comparación con el de un tejido control. El *microarreglo de ADN* permite esta comparación, que se conoce con el nombre de *differential display*.[3]

Metodología del *microarreglo de ADN*

El procedimiento para comparar el transcriptoma del tejido o cultivo celular objeto de estudio con el transcriptoma control es relativamente simple (Fig. 1). En primer lugar, se debe aislar el ARNm de ambos tejidos y, a partir de cada uno de ellos, obtener sus correspondientes ADNc. Estas moléculas de ADNc deben marcarse con un compuesto fluorescente, que será diferente en los tejidos objeto de estudio y el control. En general, el ADNc del tejido objeto de estudio se marca con el compuesto fluorescente Cy3 (que emite fluorescencia a una longitud de onda de 588 nm, lo que en el espectro correspondería a un

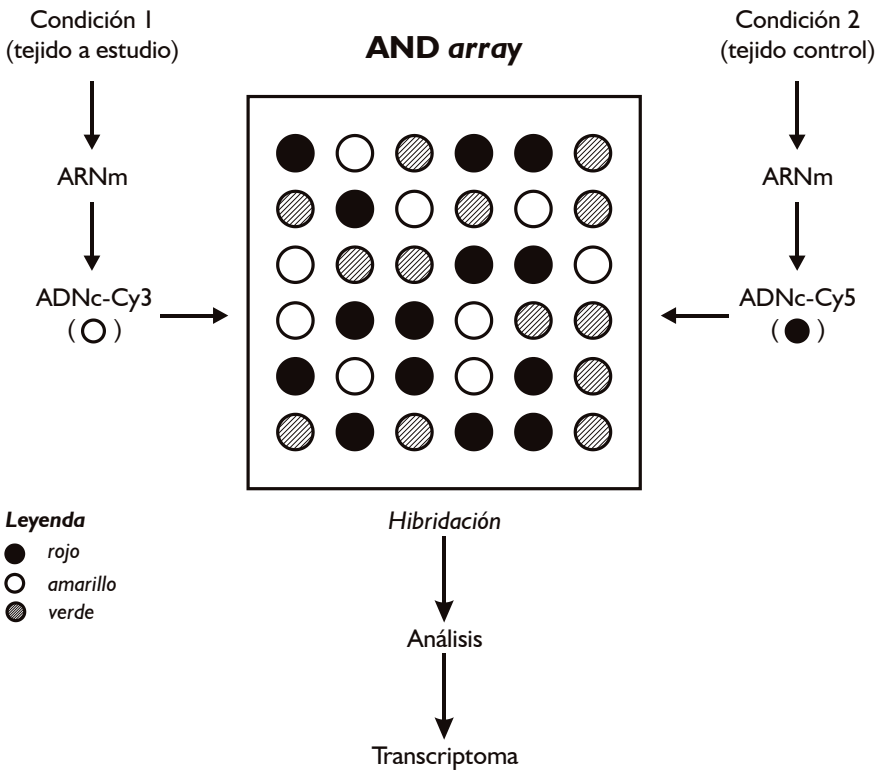

Fig. 1. *Metodología básica de un microarreglo de ADN.*

color cercano al rojo) y el del tejido control con el compuesto Cy 5 (que emite fluorescencia a una longitud de onda de 680 nm, lo que en el espectro correspondería a un color entre naranja y amarillo).

A continuación, se mezclan ambos ADNc marcados y se incuban juntos en el *microarreglo de ADN*, para que cada especie de ADNc hibride (se una) específicamente a su ADNc complementario inmovilizado en el *microarreglo de ADN*. Cuanto mayor sea la hibridación de una especie determinada de ADNc marcado con el ADNc del *microarreglo de ADN*, mayor será la expresión tisular original del ARNm correspondiente (expresoma). Pero, ¿cómo se evalúa la cantidad de hibridación existente? Se calcula determinando la longitud de onda emitida por cada uno de los dos ADNc incubados. Para ello, el sistema lector del ADN *microarreglo de ADN* asigna un código informático de colores a la cantidad de fluorescencia emitida. Si hay mayor hibridación del ADNc de la condición patológica (roja), el componente rojo de la emisión predominará, y viceversa, cuando sea mayor la hibridación del ADNc de la condición control, el componente amarillo de la emisión será el que predomine (Fig. 1). Cuando la hibridación del ADNc de los dos tejidos estudiados sea similar, el programa informático asignará un código de color verde (Fig. 1). Hay que tener en cuenta que esta diferencia de emisión debe evaluarse en cada uno de los pocillos del *microarreglo de ADN* (es decir, para cada uno de los ADNc genes evaluados). De esta manera, se compara la expresión de todos los genes representados en el *microarreglo de ADN* (hasta 40 000) en el tejido estudio frente al tejido control (*differential display*).[1-3]

¿Cómo interpretar la información proporcionada por un *microarreglo de ADN*?

El *microarreglo de ADN* proporciona información sobre los genes que han variado su expresión (tanto en el sentido de su sobreexpresión como en el de su represión) en respuesta a unas condiciones experimentales o fisiopatológicas determinadas. En definitiva, el *microarreglo de ADN* proporciona el transcriptoma característico de dichas condiciones. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la alteración en la expresión de estos genes puede ser causa o consecuencia de la enfermedad estudiada. El investigador deberá, entonces, elaborar nuevas hipótesis de trabajo para diferenciar ambas posibilidades. Por consiguiente, la tecnología del *microarreglo de ADN* debe considerarse como una tecnología "generadora de hipótesis" y no como una tecnología capaz de cerrar definitivamente cuestiones pendientes. No obstante, permite que dichas hipótesis se concreten sobre un número reducido de genes y, lo que es más importante, que dichas hipótesis se basen sobre datos objetivos (el transcriptoma específico para esas condiciones experimentales), y no sobre la interpretación de la bibliografía científica o en las preferencias subjetivas de cada investigador.[3-4]

APLICACIONES POTENCIALES DEL *MICROARREGLO DE ADN* EN ENFERMEDADES EN HUMANOS

Esta es una tecnología tan reciente que todavía se encuentra circunscrita al ámbito de la investigación. Sus aplicaciones clínicas están en fase de desarrollo. Sin embargo, cabe especular con algunas posibles aplicaciones futuras.

Cáncer

Uno de los campos de mayor aplicabilidad del *microarreglo de ADN* es el estudio de las neoplasias en áreas tales como:

a) La comprensión de las bases moleculares de la carcinogénesis: los *microarreglos de ADN* han facilitado enormemente el estudio global de los patrones de expresión génica que conducen a la pérdida de la regulación del ciclo de división celular y de la muerte celular programada (apoptosis), como mecanismos esenciales de control involucrados en la transformación maligna. Particularmente, en neoplasias inducidas por virus, los *microarreglos de ADN* han permitido dilucidar algunas de las vías de señalización que ellos emplean para inducir la transformación.[4-5]

b) La clasificación y el pronóstico: Las metodologías que existen actualmente para clasificar y establecer un pronóstico en muchos tipos de neoplasias (por ejemplo leucemias) aún son de difícil interpretación y en algunos casos no ofrecen mayor información. El estudio y clasificación de estos tumores mediante el uso de micromatrices ha facilitado la definición de patrones de expresión diferenciales que hacen posible un acercamiento más profundo a su origen molecular. La comparación de estos resultados con los obtenidos por métodos convencionales como la

citometría de flujo para marcadores de membrana y la citogenética, han permitido establecer no sólo una excelente correlación diagnóstica, sino que han impactado en aspectos como la clasificación, el tratamiento y el pronóstico. Se espera que esta tecnología simplifique en tiempo y en costos el diagnóstico, el manejo y la determinación del pronóstico de muchos tipos de neoplasias.[6]

Un marcador tumoral es cualquier indicador bioquímico cuya detección en tejido o líquido biológico pueda indicar la presencia de un tumor. Las matrices también han permitido hallar potenciales marcadores tumorales específicos. Las células en un tejido normal expresan diferentes genes cuya expresión es afectada por el proceso de transformación maligna (antígeno asociado a tumor) que genera moléculas "únicas" en forma anómala.[7]

Un ejemplo de ello es el cáncer de próstata en el cual el estudio con micromatrices ha facilitado la identificación de genes que se expresen sólo en próstata, pero que alteran su expresión únicamente en el tejido neoplásico y no en otras alteraciones como hipertrofia prostática o prostatitis.

c) Seguimiento de metástasis: en tumores tales como en el melanoma se ha podido determinar la expresión diferencial negativa de genes relacionados en la adhesión celular y con el complejo mayor de histocompatibilidad, que hacen posible diferenciar los melanomas con potencial metastático.[7]

Alergia

Aunque son pocos los trabajos publicados acerca del uso de *microarreglo de ADN* en esta área, estudios preliminares en primates han revelado perfiles de expresión diferencial de genes obtenidos de células del fluido bronquial, luego de estimulación con alérgenos e interleuquina 4. En este estudio, se pudo determinar el pico máximo de expresión génica 4 h después de la inhalación del alérgeno específico y expresión diferencial de quimioquinas, así como de factores de remodelación tisular y agentes antioxidantes. Estos estudios y otros que utilicen modelos de expresión global podrán mejorar el entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades alérgicas.[8-9]

En el campo del diagnóstico alergológico, el *microarreglo de ADN* brinda la posibilidad de detectar inmunoglobulina IgE específica para los alérgenos sensibilizantes. Es de esperarse que en las enfermedades alérgicas se intensifiquen los estudios con esta tecnología, pues el hallazgo de nuevos blancos terapéuticos para estas enfermedades tiene una amplia relación costo-beneficio.

Inmunodeficiencias primarias

En años recientes el estudio molecular de las inmunodeficiencias primarias ha permitido conocer en detalle el funcionamiento de múltiples componentes del sistema inmune. No obstante, el empleo del *microarreglo de ADN* promete ofrecer una visión global de los trastornos celulares que resultan de la ausencia de un producto crítico para el adecuado funcionamiento del sistema inmune. En un estudio reciente con dos pacientes que sufrían inmunodeficiencia combinada severa de origen molecular desconocido se trató de determinar el origen y consecuencia de la activación defectuosa de los linfocitos T. Los resultados no sólo permitieron establecer las posibles vías de activación de los linfocitos que estaban comprometidas sino que también lograron demostrar la complejidad y las posibilidades de cambios en la expresión génica durante la activación de las células T.

En otro estudio se comparó la expresión génica por medio de *microarreglo de ADN* de linfocitos B transformados provenientes de un paciente con gammaglobulinemia congénita y un control sano, se encontró una expresión disminuida en 9 secuencias de función desconocida y expresión aumentada de los genes Fyn, Hck y Cyp1B1. Estos hallazgos demostraron la posibilidad de utilizar esta metodología para estudiar la influencia de las mutaciones del gen Btk en los linfoctios B de estos pacientes.[10]

Enfermedades autoinmunes

El amplio espectro de genes involucrados en la patogenia de las enfermedades autoinmunes y que potencialmente afectan el curso de estas, hace que el *microarreglo de ADN* sea práctico para el análisis de estas afecciones. En casos tales como la artritis reumatoidea, en la que se observa una respuesta inflamatoria crónica del tejido sinovial y cartilaginoso, los estudios realizados con el *microarreglo de ADN* han revelado la sobreexpresión de genes, tales como la interleuquina 3, la quimioquina GROa, la metaloproteasa de matriz metaloelastasa, el inhibidor de la metaloproteasa 1 y la cadena liviana de la ferritina. Se postula que estos genes podrían participar en el desarrollo inflamatorio característico de esta enfermedad.[11]

Enfermedades infecciosas

En el estudio de las enfermedades infecciosas el *microarreglo de ADN* ha sido de gran utilidad ya que es posible visualizar la manera cómo los diferentes genes se modulan del sistema inmune simultáneamente en respuesta al reto infeccioso. Así, se han encontrado patrones de expresión génica diferenciales en las células afectadas por microorganismos como: *Helicobacter pilory*,[12] *Bordetella pertussis*,[13] *Toxoplasma gondii*,[14] *Tripanosoma cruzi*,[15] virus coxsackie B3,[16] citomegalovirus,[17] papilloma virus humano 3 y virus del sarampión,[18] entre otros. Estos estudios han permitido dilucidar la forma en la cual las células hospederas son influenciadas por los diferentes tipos de infección y la respuesta que ellas generan.

Estos estudios no sólo han permitido conocer la interacción entre el hospedero y los microorganismos; sino que también han facilitado la identificación de nuevos blancos de vacunas[19] e incluso el reconocimiento de nuevos factores de virulencia.[20] La identificación molecular de microorganismos[21] y una mayor precisión de las pruebas serológicas,[22] constituyen otras de las aplicaciones del *microarreglo de ADN* que en un futuro cercano se beneficiarán de esta tecnología.

CONCLUSIONES

Las promesas que surgieron hace unos años respecto a la tecnología de *microarreglo de ADN* con aplicaciones en la salud humana se han cumplido con creces y hoy por hoy, supone una herramienta imprescindible en cualquier proyecto de genómica y proteómica. Resulta de especial importancia no solo el mayor número de investigaciones que emplean esta tecnología, sino las diferentes aplicaciones que han surgido de ella.

BIBLIOGRAFIA

1. Busquets X. y Agustí A.G.N. Chip genético (ADN microarreglo de ADN): el futuro ya está aquí. **Arch. Bronconeumol.**, **37**, 394-396, 2001.
2. Albelda S.M. and Sheppard D. Functional genomics and expression profiling: be there or be square. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **23**, 265-269, 2000.
3. Lockhart D.J. and Winzeler E.A. Genomics, gene expression and DNA microarray. **Nature.**, **405**, 827-836, 2000.

4. Bucca G., Carruba G., Saetta A., Muti P., Castagnetta L. and Smith C.P. Gene Expression Profiling of Human Cancers. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **1028**, 1-10, 2004. New York Academy of Science, 2004.
5. Ramaswamy S. and Golub T.R. DNA microarrays in clinical oncology. **J. Clin. Oncol.**, **20**, 1932-41, 2002.
6. Xu J, Stolk J.A, Zhang X, Silva S.J, Houghton R.L and Matsumura M, *et al*. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. **Cancer Res.**, **60**, 1677-82, 2000.
7. Brem R., Hildebrandt T., Jarsch M., Van Muijen G.N.and Weidle U.H. Identification of metastasis-associated genes by transcriptional profiling of a metastasizing versus a non-metastasizing human melanoma cell line. **Anticancer Res.**, **21**(3B), 1731-40, 2001.
8. Zou J., Young S., Zhu F., Gheyas F., Skeans S. and Wan Y., *et al*. Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma. **Genome Biol.**, **3**, research0020.1-0020.13, 2002.
9. Bacarese-Hamilton T., Mezzasoma L., Ingham C., Ardizzoni A., Rossi R. and Bistoni F., *et al*. Detection of allergen-specific IgE on microarray by use of signal amplification techniques.**Clin. Chem.**, **48**, 1367-70, 2002.
10. Holm A.M., Bjerkeli V., Yndestad A., Aukrust P. and Frôland S.S. Gene expresion in common variable immunodeficiency. 10th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID), 2002.
11. Heller R.A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T. and Gilmore J., *et al*. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using DNA microarray. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **94**, 2150-5, 1997.
12. Guillemin K., Salama N.R., Tompkins L.S. and Falkow S. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **99**, 15136-41, 2002.
13. Belcher C.E., Drenkow J., Kehoe B., Gingeras T.R, McNamara N. and Lemjabbar H., *et al*. From the cover: the transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **97**, 13847-52, 2000.
14. Blader I.J., Manger I.D. and Boothroyd J.C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. **J. Biol. Chem.**, **276**, 24223-31, 2001.
15. De Avalos S.V., Blader I.J., Fisher M., Boothroyd J.C. and Burleigh B.A. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. **J. Biol. Chem.**, **277**, 639-44, 2002.
16. Taylor L.A., Carthy C.M., Yang D., Saad K., Wong D.and Schreiner G. *et al*. Host gene regulation during coxsackie virus B3 infection in mice: assessment by microarray. **Circ. Res.**, **87**, 328-34, 2000.
17. Zhu H., Cong J.P., Mamtora G., Gingeras T. and Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide microarray. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **95**, 14470-5, 1998.
18. Chang Y.E., Laimins L.A. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. **J. Virol.**, **74**, 4174-82, 2000.
19. Grifantini R., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelica E. and Berger J., *et al*. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarray. **Nat. Biotechnol.**, **20**, 914-2, 2002.
20. Graham M.R., Smoot L.M., Migliaccio C.A., Virtaneva K., Sturdevant D.E. and Porcella S.F., *et al*. Virulence control in group A Streptococcus by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **99**, 13855-60, 2002.
21. Cleary M.D., Singh U., Blader I.J., Brewer J.L. and Boothroyd J.C. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. **Eukaryot. Cell.**, **1**, 329-40, 2002.
22. Mezzasoma L., Bacarese-Hamilton T., Di Cristina M., Rossi R., Bistoni F. and Crisanti A. Antigen microarray for serodiagnosis of infectious diseases. **Clin. Chem.**, **48**, 121-30, 2002.

OZOMED mini

OZOMED mini® está diseñado para las aplicaciones médicas del ozono.

Para el tratamiento de: neuropatías ópticas, glaucoma crónico, síndrome cócleo vestibular, retinosis pigmentaria, demencias seniles, anemia drepanocítica, prevención de sepsis, artrosis, arteriosclerosis obliterante y como medio de contraste en angiografías intradiafragmáticas.

Especialidades: Oftalmología, Geriatría, Ortopedia, Angiología y Medicina Interna.

Vías de aplicación: intravenosa, intra-arterial, intrarrectal, intramuscular, autohemoterapia mayor y menor, intracavitaria, subcutánea y tópica.

Instalación y montaje: solo requiere alimentación eléctrica y un botellón de oxígeno medicinal que se interconecta al equipo mediante una manguera de PVC flexible de diámetro interior 5 mm que se coloca a la entrada del flujómetro.

Características técnicas

Cubierta de poliestireno de gran densidad e impacto.
Dimensiones: (LXHXP) (340X220X150) mm.
Peso: 2,8 kg (6,16 lb).
Alimentación: ~110 V ± 10 %; 60 Hz .
Temperatura de trabajo: 15 a 30 °C .
Humedad relativa: hasta 90 %.
Presión de O_2 a la salida del botellón: hasta 1 atm.
Concentración de ozono: hasta 70 mg/L .
Tiempo de trabajo continuo máximo: 20 min ± 10 %.
Potencia: 50 VA ± 2 %.
Flujo de trabajo de O_2 medicinal seco: hasta 1,5 L/min .

Centro de Investigaciones del Ozono
Avenida 15 y calle 230 No. 1313, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6412, Cuba.
Teléfono: (53) 7 271 2089. Fax: (53) 7 271 0233. ozono@infomed.sld.cu http://www.ozono.cubaweb.cu