

Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades

Guido Lastra L.¹, Camila Manrique A.²

Resumen

En este artículo analizamos la importancia de los microarreglos como herramienta para el conocimiento de las enfermedades, la forma como se estudian, su clasificación y diferentes tipos, y la forma como se analizan los datos y las aplicaciones clínicas de los microarreglos de ADN.

Palabras clave: microarreglos, ADN, ADNc, ARN, ARNm, oligonucleótidos.

Summary

In this paper we analyzed the importance of the microarrays like tool for the knowledge of the diseases, the form as they are study, its classification and different types, and the form as the data and the clinical applications of the DNA microarrays are analyzed

Key words: microarrays, DNA, cDNA, RNA, mRNA, Oligonucleotides.

Introducción

El proyecto Genoma Humano arrojó gran cantidad de información y de anotaciones sobre el genoma humano; sin embargo el conocer la función de cada una de las secuencias identificadas es un campo en el que aún se trabaja de forma activa, y una de las

técnicas que se han utilizado para facilitar la identificación y la clasificación de estas secuencias son los Arreglos de Matriz ¹.

Con el nombre de Arreglos de Matriz se ha denominado la técnica de biología molecular por medio de la cual es posible inmovilizar en un plato material genético conocido y luego hibridarlo con material genético marcado para estudio¹. Las técnicas de arreglos de matriz se desarrollaron inicialmente como parte complementaria del proyecto genoma humano con el fin de analizar ácido desoxirribonucleico (ADN) por hibridación².

Las técnicas iniciales de arreglos de matriz han sido remplazadas por los Microarreglos de ADN ². En 1994 *Affymetrix* (compañía de biotecnología californiana) desarrolló, por medio de técnicas fotolitográficas, arreglos de ADN de alta densidad. Arreglos de menor tamaño se idearon posteriormente constituyendo los microarreglos de ADN o CHIPS. Los microarreglos modernos pueden contener aproximadamente 20.000 a 30.000 genes², lo cual hace posible que en un único microarreglo se pueda estudiar todo el genoma de especies como la humana, en platos o losas de 1 a 2 cm^{2,3}.

Los microarreglos constituyen un importante avance ya que permiten evaluar, en un espacio reducido, la expresión de un gran número de genes. Es posible conocer la expresión génica en una única

1 MD. D.Sc. profesor Titular.

2 MD. Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Unidad de Endocrinología.

Recibido para publicación: mayo 27/05

Aceptado en forma revisada: agosto 26/05

célula, comparar la expresión génica entre una célula sana y una enferma, y también estudiar la expresión génica entre diferentes tejidos.

A pesar de su reciente introducción, esta tecnología ha experimentado un gran auge al proveernos de una herramienta que permite realizar avances rápidos en el conocimiento de diversas patologías desde el punto de vista de la biología molecular.

Microarreglos de ADN

Los arreglos de ADN son placas de vidrio, nylon o silicona, compuestas por pozos de 100-300mm, en las cuales cientos o miles de secuencias de genes se inmovilizan. El material genético fijado a la base puede ser ADN, ADN complementario (ADNc) u oligonucleótidos¹. El uso de oligonucleótidos, aun cuando es más exigente técnicamente, tiene la ventaja de no requerir para su manufactura la entrada a grandes librerías de ADNc y de distinguir entre secuencias con alto grado de similitud y variantes de splicing; sin embargo su precio es más elevado⁴.

El proceso de los microarreglos basado en la hibridación utiliza moléculas de ácidos nucleicos (ADN, ADNc u oligonucleótidos) que funcionan como sondas y se hibridan con ácidos nucleicos complementarios provenientes de la muestra en estudio, los cuales han sido marcados por diferentes métodos.

Generalmente, los blancos se generan a partir de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la célula o tejido de interés que se convierte en ADNc. Se necesitan en promedio 1 a 2 microgramos de ARNm o 10 microgramos de ARN para el diseño del microarreglo⁵. Los blancos están marcados con material fluorescente (Cy3, Cy5 o biotina) que luego puede ser detectado mediante fotoimagen o escáner de fluorescencia.

La alta reproducibilidad de los experimentos con oligonucleótidos permite comparaciones precisas de las señales generadas usando muestras hibridadas en diferentes arreglos. Los *spotted arrays* son microarreglos en que un robot coloca en puntos o *spots* determinados el ADNc (al contrario de los microarreglos de oligonucleótidos en que el material se sintetiza *in situ*); no permiten, sin embargo, una comparación suficientemente exacta entre diferentes experimentos⁴. Estas consideraciones tienen

implicaciones en el análisis de los datos obtenidos, y en el tipo de conclusiones que se obtendrán.

Posterior a la hibridación se debe llevar el experimento a la lectura. La marcación fluorescente de los residuos se hace evidente mediante láser, cámara y microscopio que crean una imagen digital del arreglo. Estos datos se llevan al computador y un programa analiza la emisión de colores. Cada punto en el arreglo se asocia con un gen en particular, y dependiendo del tipo de arreglo, los colores obtenidos aportarán información sobre la expresión génica^{1,4,5}.

Tipos de Microarreglos

Existen 3 clases de sondas que pueden ser utilizadas para el diseño de microarreglos: dos son genómicas (unas pueden detectar pérdida o ganancias de genes y otras pueden detectar mutaciones en el ADN) y una es transcriptómica (mide los niveles de ARNm). La diferencia entre cada una de ellas es el tipo de ADN que se inmoviliza en los platos¹.

Microarreglos que detectan cambios en la expresión génica

Cuando se desea determinar un cambio en el nivel de expresión de cierto gen, debe realizarse un análisis de expresión por microarreglos, con los llamados CHIPS de expresión. El ADN inmovilizado por hibridación es ADNc producto de ARNm de genes conocidos. Este proviene de células de tejidos sanos (control) y enfermos (muestra a estudio). Si un gen se sobreexpresa en cierta enfermedad, mayor cantidad de ADNc se hibridará en el punto (spot) que representa el gen afectado; por consiguiente las intensidades de fluorescencia serán disímiles entre el grupo a estudio y el grupo control. Una vez que se caractericen los genes involucrados en ciertas enfermedades, el ADNc de las células humanas podrá ser hibridado para determinar si la persona tiene el patrón de expresión génica relacionada con alguna enfermedad, y se logrará un diagnóstico y tratamiento oportunos.

Los CHIPS de expresión génica también pueden ser usados para determinar cambios en la expresión durante un periodo de tiempo, como por ejemplo durante el ciclo celular. Esto representa una importante herramienta en la investigación en cáncer, ya que se podrían identificar por este métodos nuevos marcadores cancerígenos con propósitos diagnósticos.

Adicionalmente proteínas que se expresan en las células tumorales en ciertas etapas del ciclo podrían convertirse en el blanco de nuevas estrategias terapéuticas.

Los CHIPS de expresión también pueden ser usados para desarrollar nuevos medicamentos, y así determinar si un medicamento afecta la expresión de ciertos genes de células cancerígenas^{1,4,6}.

Microarreglos que detectan ganancias y pérdidas de genes (pérdida de heterogenicidad)

Ciertas pérdidas o ganancias cromosómicas están relacionadas con la progresión del cáncer y los patrones de estos cambios son importantes para establecer un pronóstico clínico. Con el uso de microarreglos y el análisis de sus resultados se podría predecir cuáles regiones cromosómicas contienen genes que inician y mantienen procesos tumorales. Los resultados pueden ser visualizados en diagramas jerárquicos referidos como “modelos en árbol de progresión del tumor”¹.

La técnica de **Microarreglos de Hibridación Genómica Comparativa** permite visualizar ganancias y pérdidas o cambios en el número de copias de un gen particular involucrado en determinada patología. En este tipo de microarreglos se usan grandes porciones de ADN genómico que sirven como ADN inmovilizado en el plato y cada punto o spot de ese ADN representa una región cromosómica conocida. La mezcla a hibridizar contendrá ADN genómico marcado, proveniente de tejido enfermo y tejido sano.

Si el número de copias del gen de interés están aumentadas, una gran cantidad de ADN de la muestra se hibridizará en los puntos o spots del microarreglo que representan el gen involucrado, mientras que al utilizar muestra proveniente de tejido sano sólo un pequeño número se hibridizará en el mismo punto. Dicha diferencia en la cantidad de material hibridizado podrá reflejarse en fluorescencias disímiles y así será detectado por el escáner y por los programas de lectura.

Microarreglos que detectan mutaciones en el ADN

Cuando se utilizan los microarreglos para detectar mutaciones o polimorfismos en una secuencia génica,

el ADN inmovilizado suele ser un único gen; el material colocado en otros pozos puede diferir solamente en uno o en unos cuantos nucleótidos. Un tipo de secuencia que suele utilizarse para este tipo de análisis son los *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) o **Polimorfismo de nucleótido único**, pequeña variación genética que puede ocurrir dentro del ADN de un individuo. En este tipo de experimento se necesita ADN genómico derivado de una muestra normal para ser usado en la mezcla de hibridización.

Una vez que los investigadores han establecido que un SNP se relaciona con una enfermedad de interés, pueden usar la tecnología para detectar quiénes tienen o son susceptibles de tener la enfermedad.

Cuando el ADN genómico de un individuo se hibridiza con un arreglo cargado de varios SNPs, el ADN muestra (*target*) se hibridizará con mayor frecuencia con los SNPs asociados al individuo a estudio. Estos puntos del microarreglo tendrán mayor fluorescencia y se demostrará que dicha persona es susceptible o tiene determinada enfermedad¹.

Análisis de datos de microarreglos

Hasta el momento no existe un método único universalmente aceptado para el análisis de los datos, y aún es controversial lo que se puede aprender sobre biología celular usando microarreglos^{4,6,7}.

El investigador puede usar los microarreglos para responderse preguntas sobre los problemas biológicos de 2 diferentes maneras⁴: por un lado, el sujeto puede estar interesado sólo en encontrar un cambio particular en determinado gen que ayude a explicar cierta alteración en un fenotipo (los chips de expresión mencionados), lo que puede ser visto como una aproximación local al análisis de expresión génica. De otro lado, el objetivo del investigador puede ser el de observar los patrones globales de la expresión génica para así entender la organización de las redes regulatorias génicas, es decir una aproximación global.

Análisis local

Inicialmente el interés de los científicos que usaban la tecnología de los microarreglos se concentró en la identificación de genes individuales, cuya expresión podía explicar un fenómeno biológico particular, pero posteriormente se evidenció que los experimentos de microarreglos eran capaces de producir largas listas de genes con expresión alterada

(aumentada o disminuida), pero daban poca información sobre cuáles eran los cambios importantes para establecer cierto fenotipo. Un estímulo particular a estudio podría llevar a cambios en el ARNm de cientos de genes: esto llevaría al investigador a dar importancia sólo a los genes que ya tuvieran alguna función o característica de interés descrita en la literatura; como es de suponer, se introducirían sesgos en el análisis generando pérdida en la validez de los resultados⁸.

A pesar de los inconvenientes, el análisis local de microarreglos ha arrojado importantes resultados; así se han reconocido genes previamente desconocidos que son blanco de acción de algunos factores de transcripción oncogénicos (**MYC**, **WT1** y **p53**)⁹.

Análisis de redes de expresión génica

El verdadero potencial de los microarreglos se ha vislumbrado cuando han sido usados para dar aproximaciones globales de patrones de expresión génica. Se han realizado análisis a gran escala de cambios en la expresión génica de levadura y de organismos animales para identificar genes con patrón de expresión similar. Para este fin se han desarrollado interesantes programas computarizados que le facilitan al investigador la realización del análisis⁷.

Inicialmente, se deben identificar dentro de los resultados del experimento los genes que presentan cambios significativos. Lo anterior se realiza por medio de la filtración de genes y la identificación de genes activos. Luego de obtener datos depurados se aplican métodos de agrupamiento o *clustering*. Se han descrito varios (agrupamiento jerárquico, mapas autoorganizantes, k-means), cada uno con ventajas y desventajas^{7,10-12}. Actualmente se recomienda utilizar más de una técnica con cada grupo de datos. La idea de identificar *clusters* o particiones de genes es que los genes que tienen patrones de expresión cercanos contendrían mecanismos regulatorios iguales, y eventualmente se podrían crear mapas de control de transcripción exactos. Adicionalmente, los genes coregulados pueden ayudar a la asignación de funciones a genes descubiertos *de novo*⁷.

Aplicaciones médicas de los microarreglos de ADN

El uso de los microarreglos para desarrollar perfiles de expresión génica, genotipos, detección de

mutaciones y descubrimientos de genes permitirá realizar grandes avances en la detección, seguimiento y tratamiento de muchas patologías³.

La tecnología de los microarreglos le ofrece a todas las áreas de conocimiento médico grandes herramientas; es justo decir que es la oncología el área que más provecho y avances ha alcanzado, mas no la única.

Por ejemplo, en el estudio de las leucemias agudas se utilizaron los perfiles de expresión de 6817 genes para distinguir entre leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mielocítica aguda; 36 de 38 muestras sin clasificar fueron correctamente designadas usando este método y se logró dividir con éxito las poblaciones de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) provenientes de linfocitos T y las provenientes de linfocitos B, así como aclarar la presencia de 50 genes predictores de la patogenia de la enfermedad³.

En el campo de la endocrinología se han utilizado los microarreglos con especial interés en el estudio de la obesidad y la DM2.

Se han identificado genes relacionados con la resistencia a la insulina en ratas; uno de estos genes, el Cd36 o translocasa de ácidos grasos, se mapeó en una región cromosómica donde previamente se había localizado un gen de resistencia a la insulina, y las alteraciones en este gen resultaron en fallas en el metabolismo de glucosa y lípidos³.

Nadler y colaboradores usaron los microarreglos de oligonucleótidos de *Affymetrix* para estudiar ratones delgados y ratones obesos carentes de leptina (*ob/ob*) y determinaron cambios en el perfil de expresión génica. Evidenciaron que en los ratones obesos se disminuye la expresión de genes que normalmente se expresan durante el periodo de diferenciación del adipocito (factores de transcripción SREBP1, PPAR γ 2, C/EBP α y factores involucrados en el metabolismo lipídico como SCD1, ATP-citrato liasa y glicerol 3 fosfato deshidrogenasa); así mismo encontraron que se sobreexpresan genes como el colágeno proalfa 1, cuya expresión está disminuida durante la diferenciación del adipocito. Se concluye que el patrón de expresión del adipocito en el ratón obeso es reverso al patrón de expresión génica en el periodo de diferenciación del adipocito¹³.

Soukas y colaboradores también usaron microarreglos de oligonucleótidos para estudiar los perfiles de expresión génica de ratones obesos con infusión de leptina y con restricción de comida. Basalmente, se notó que el ARNm de muchos de los genes involucrados en la adipogénesis se encontraba en menor cantidad al comparar los ratones obesos con los ratones delgados. Entre los genes afectados se encontraban el de la sintetasa de ácidos grasos, la escualeno sintetasa y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa. La infusión de leptina y la restricción de comida normalizaron solo algunos de los cambios ¹³.

Con los anteriores hallazgos se puede proponer que la falta de capacidad lipogénica del tejido adiposo del obeso recargaría de lípidos a los otros tejidos, y especialmente al hígado y que si el hígado no tolera dicha carga el obeso desarrollará diabetes ¹³.

Shuit y colaboradores ¹⁴ usaron los microarreglos de alta densidad para estudiar el papel de la glucosa sobre la transcripción génica en la célula beta. Dos diferentes análisis de microarreglos demostraron que la glucosa influencia la expresión de múltiples genes involucrados en metabolismo energético, en la secreción de insulina, en el transporte de membrana, en la transcripción génica y en el metabolismo proteico. El análisis funcional de algunos de los *clusters* o agrupamientos identificados provee evidencia a favor del concepto de que la cataplerosis (conversión de metabolitos mitocondriales a intermediarios lipídicos) es una importante vía en la activación de la célula beta independiente de canales de potasio ATP dependientes.

Castro-Chávez F. y cols¹⁵ estudiaron por medio de microarreglos de ADN el efecto de la ausencia y presencia del gen de la perilipina (*plin*) en ratones sobre los perfiles de expresión génica. Los ratones sin perilipina son delgados y resistentes a la obesidad. Por medio del uso de la técnica de microarreglos se notó que en los ratones *plin*^{-/-} había una regulación a la alta cantidad de genes involucrados en la β -oxidación, en el ciclo de Krebs y en la cadena mitocondrial de transporte de electrones, al mismo tiempo que se evidenciaba un regulación a la baja de los genes involucrados en la biosíntesis de lípidos. Los autores proponen, con estos hallazgos, que en ausencia de perilipina el tejido adiposo blanco activa vías para gastar energía y librarse de los produc-

tos lipólisis (que se encuentran aumentados), lo que se ha relacionado con resistencia a la obesidad ¹⁵.

Los anteriores ejemplos ilustran las posibilidades que los microarreglos de ADN abren para el mejor entendimiento de patologías convertidas hoy en epidemias mundiales como son la obesidad y la DM2. Pero no se debe olvidar que habrá que solucionar problemas como los altos costos que esta técnica implica, lo que puede hacerla de difícil alcance en países como el nuestro, y la necesidad perfeccionar el análisis de sus resultados para un mejor aprovechamiento de los mismos.

Referencias

1. Microarrays factsheet en www.NCBI.com.
2. Cook S., Rosenzweig A. DNA microarrays Implications for Cardiovascular Medicine. Stuart A. Cook, Anthony Rosenzweig. *Circulation Research* 2002; 91: 559-564.
3. Aitman T. DNA microarrays in medical practice. *British Medical Journal* 2001; 323: 611-615.
4. Schulze A. Navigating gene expression using microarrays a technology review. *Nature Cell Biology* 2001; 3: E190-195.
5. Copland J., Davies P. The Use of DNA Microarrays to Assess Clinical Samples: The Transition from Bedside to Bench to Bedside. *Recent Progress in Hormone Research* 2003; 58: 25-53.
6. Mills J., Roth K y cols. DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell. *Nature Cell Biology* 2001; 3: E175-178.
7. Kaminsky N., Friedman N. Practical Approaches to Analyzing Results of Microarrays Experiments. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002; 27: 125-132.
8. Hatfield W., Hung S., Baldi P. Differential analysis of DNA microarrays gene expression data. *Molecular Microbiology* 2003; 47: 871-877.
9. Schulze A., Downward J. Analysis of gene expression by microarrays: cell biologist's gold mine or minefield? *Journal of Cell Science* 2000; 113: 4151-4156.
10. Sherlock G. Analysis of large scale gene expression data. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12: 201-205.
11. Eisen M., Spellman P, y cols. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863-14868.
12. Heyer L y cols. Exploring expression data: identification and analysis of coexpressed genes. *Genome Research* 1999; 9: 1106-1115.
13. Nadler S., Attie A. Please Pass the Chips: Genomic Insights into Obesity and Diabetes. *J. Nutr.* 2001; 131: 2078-2081.
14. Shuit F. y cols. Glucose-Regulated Gene Expression Maintaining the Glucose-Responsive State of β -Cells. *Diabetes* 2002; 51: S326-S332.
15. Castro-Chávez F. Coordinated Upregulation of Oxidative Pathways and Downregulation of Lipid Biosynthesis Underlie Obesity Resistance in Perilipin Knockout Mice: A Microarray Gene Expression Profile. *Diabetes* 2003; 52: 2666-2674.