

MICRO Y NANOTECNOLOGÍA EN MEDICINA: LOS CHIPS O MICROARRAYS DE ADN

Ana Dopazo González

*Responsable de la Unidad de Análisis Genómico
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas*

INTRODUCCION

La aplicación de la nanotecnología a la investigación biomédica se remonta al menos unas pocas décadas atrás, cuando las técnicas de la ingeniería genética hicieron posible la manipulación del DNA (o ADN). En realidad, los seres vivos y entre ellos el hombre, objeto de estudio de la medicina, es el resultado de un proceso de nanotecnología natural. Estamos formados por células de escala micrométrica cuyo comportamiento viene gobernado por el funcionamiento orquestado de moléculas de escala nanométrica de acuerdo con leyes químicas, físicas y biológicas.

No en vano medicina y salud son campos privilegiados en donde investigar y desarrollar los avances de la multidisciplinar área de la micro- y la nanotecnología, y donde su aplicación promete resultados revolucionarios: No sólo por posibilitar la creación de estructuras de escala nanométrica de gran potencial diagnóstico y terapéutico, sino porque permite abordar de forma novedosa el conocimiento detallado de cómo funciona el cuerpo humano, abriendo así nuevas perspectivas en la prevención y el tratamiento de las enfermedades.

Aunque lo que hoy conocemos como nanotecnología es todavía una disciplina emergente, entre sus principales líneas de investigación y desarrollo con aplicación en las áreas de medicina y salud destacan la creación de nuevos productos médicos que faciliten la administración de fármacos *in situ*, el *screening* de nuevas drogas, los métodos diagnósticos, el seguimiento de los pacientes y las intervenciones quirúrgicas mínimamente invasivas, entre otras.

Así, se habla de distintas modalidades de “pastillas inteligentes” que favorezcan terapias no agresivas, como por ej., durante el proceso de administración de fármacos, de manera que éstos alcancen su órgano diana sin causar efectos laterales no deseados; de la fabricación de órganos, tejidos e implantes artificiales mediante el uso de nanomateriales biocompatibles; de la utilización de biosensores con fines preventivos y de diagnóstico precoz, etc.

Conceptos más futuristas incluyen el desarrollo de dispositivos integrados capaces de alcanzar específicamente células alteradas (por ej. células tumorales), detectar defectos en el RNA, DNA o proteínas, seleccionar una droga apropiada en base a estas características, inducir un tratamiento no invasivo, documentar la respuesta al tratamiento e identificar células enfermas residuales.

En la medicina molecular el empleo de herramientas micro y nanotecnológicas ha desencadenado ya cambios revolucionarios gracias a los enormes logros en el campo de la Genómica. La secuenciación del genoma humano es un ejemplo de estos logros, sin embargo una lista de todos los genes no nos dice qué hacen esos genes, cómo funciona una célula, cómo las células forman los organismos, qué cambios conducen a la enfermedad, etc. y son necesarias nuevas tecnologías que contribuyan a responder estas preguntas.

De entre estas nuevas tecnologías, merece mención especial por su potencial una tecnología cuyo desarrollo ha sido posible gracias al avance de los procesos de miniaturización y cuyo impacto en el área biomédica ya ha comenzado: *la técnica de los chips o microarrays de DNA*.



Dña. Ana Dopazo González

Un microarray de DNA propiamente dicho consiste en un soporte sólido, por ejemplo un cristal de microscopio, en el que se encuentran representados de manera ordenada (*arrayed*) miles de genes; cada gen está representado por un fragmento específico de DNA (cDNA u oligonucleótido) inmovilizado sobre la superficie y que ha sido depositado por un robot o sintetizado *in situ* (caso de los chips comerciales de Affymetrix).

A esta técnica y a su aplicación en el área de la medicina, en particular en cáncer, está dedicado este artículo.

LOS MICROARRAYS DE DNA COMO HERRAMIENTA PARA EL ANALISIS COMPARADO DE LA EXPRESION GENICA.

Aunque la utilización de los microarrays de DNA esta siendo contemplada en investigación con múltiples propósitos (por ejemplo para los estudios de polimorfismo de único nucleótido o SNPs, que determinan la variación natural entre secuencias de DNA que puede indicar predisposición a ciertas enfermedades genéticas), su aplicación más importante hasta la fecha está en la monitorización de la expresión génica (abundancia de RNA mensajero) de un sistema biológico dado, ya sea una célula, un órgano o un tejido.

Explicado de una manera sencilla y de acuerdo con el “dogma central” de la biología molecular, un gen ejecuta su cometido mediante la transcripción de su DNA en RNA mensajero (también denominado mARN o mRNA), el cual, a su vez, es traducido en una proteína, que es la efectora final de la función del gen. Sólo una fracción de los genes que contiene el DNA de una célula humana están siendo usados o “expresados” en una célula determinada en un momento dado. Por ejemplo genes específicos de los eritrocitos, como los de la hemoglobina, no son expresados en las células cerebrales.

El conjunto de genes que son expresados o transcritos a partir del DNA genómico, y que constituye el denominado “transcriptoma” o “perfil de expresión”, es un importante determinante del

fenotipo y la función celular. Una célula o un órgano cualquiera, por ej. un hígado sano, pueden definirse molecularmente en términos de expresión génica, describiendo su población de mRNAs, la fracción del RNA que se va a traducir en proteínas. Diferencias en la expresión génica son responsables de diferencias morfológicas y fenotípicas; si se analizan en paralelo dos muestras biológicas semejantes, por ejemplo un hígado enfermo y un hígado sano, las funciones de los genes que muestren un nivel de expresión diferente en las dos situaciones están directa o indirectamente implicadas en que se presente un estado normal o un estado patológico.

Los microarrays de DNA nos permiten analizar el mRNA de las muestras estudiadas mediante ensayos de hibridación: cada una de las especies de mRNA de las muestras interrogadas, una vez extraídas y marcadas, son capaces de formar una doble cadena o “aparearse” con aquellas moléculas de DNA inmovilizadas en la superficie del chip que tengan una secuencia complementaria a la suya, de acuerdo con las propiedades de complementariedad de bases de la estructura de los ácidos nucleicos. La estrategia de esta técnica está representada en la Figura 1.

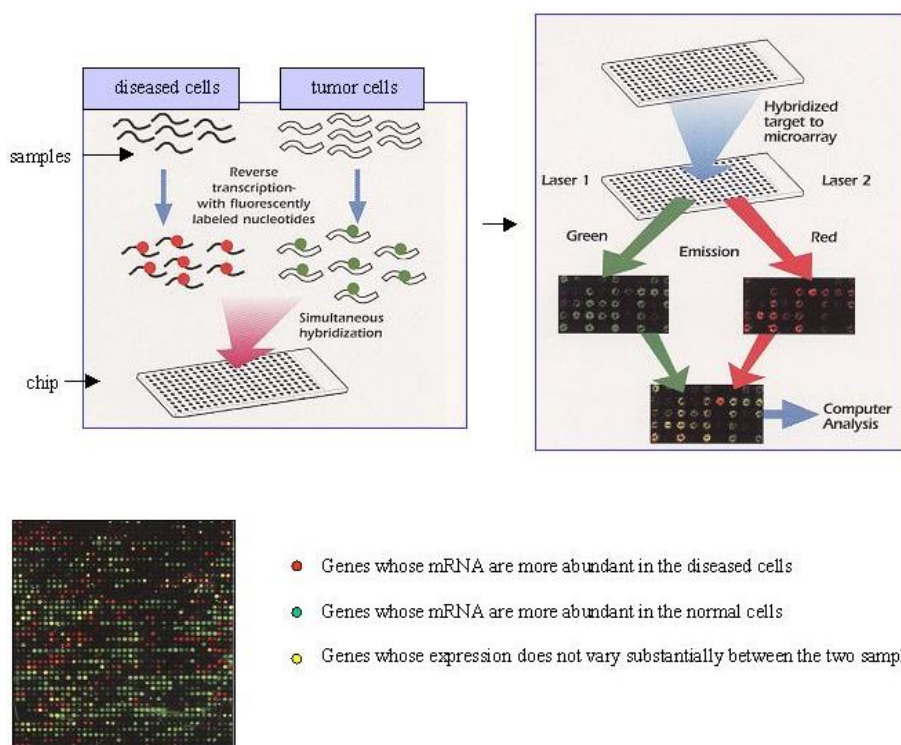


Fig. 1. DNA microarrays strategy

Un chip en el que se encuentran representados miles de genes, puede ser hibridado simultáneamente con dos sondas marcadas diferencialmente (por ejemplo con los fluorocromos Cy3 y Cy5) generadas a partir del mRNA de las muestras a comparar (por ejemplo, tejido normal versus tejido tumoral). Después de la hibridación, y utilizando un escáner, puede medirse en cada posición de DNA la intensidad de la fluorescencia para cada uno de los fluoróforos; en cada caso, el nivel de señal detectado en una posición determinada es proporcional al número de copias de mRNA de ese gen que hay en la muestra interrogada; el cociente de la intensidad de fluorescencia (Cy3/Cy5) es una medida de la expresión génica comparada relativa al gen representado en esa posición del chip.

Aunque se han desarrollado diferentes plataformas para llevar a cabo el análisis comparado de la expresión génica utilizando microarrays (los mRNAs bajo estudio pueden marcarse de diferentes maneras, el DNA inmovilizado en el chip puede ser un oligonucleótido o cDNA, etc.), todos ellos comparten la simplicidad del diseño experimental mostrado en la Figura 1.

EL POTENCIAL DE LA TÉCNICA DE LOS MICROARRAYS DE DNA

Conceptualmente, la técnica de los microarrays de DNA no es nueva. Ya en los años 80 existían técnicas, como el *screening* diferencial, que permitían detectar genes cuyo nivel de expresión era diferente en distintas situaciones biológicas, por ejemplo entre células tumorales y células normales, o entre regiones diferentes del cerebro. Sin embargo, gracias al desarrollo de las técnicas de miniaturización, hoy se pueden analizar muchos más genes al mismo tiempo, miles de genes. Y además la secuencia de estos miles de genes se conoce, gracias a la secuenciación del genoma humano. Con la técnica de los microarrays de DNA es posible analizar en un único chip de DNA todo el genoma.

Esta capacidad de análisis masivo y simultáneo es la que ha permitido un salto en las posibilidades que esta técnica ofrece, no sólo cuantitativo (se analizan muchos más genes), sino cualitativo: el poder de la técnica radica en la posibilidad de aportar una visión molecular global de un determinado proceso patológico, por ejemplo de un tipo tumoral concreto. Este conocimiento global permite entrever el funcionamiento orquestado de los genes, de cómo ellos, y por tanto las proteínas para las que codifican, interaccionan entre sí en una circunstancia determinada. Y qué es diferente entre un estado normal y uno patológico.

APLICACIONES DE LOS MICROARRAYS DE DNA EN BIOMEDICINA Y EN EL PROCESO DE DESCUBRIMIENTO DE FARMACOS: MICROARRAYS DE DNA Y CANCER

Aunque la tecnología de los microarrays de DNA está siendo ensayado en numerosas áreas de la medicina, son de destacar sus aplicaciones en el área del cáncer, donde en los últimos 3 años el crecimiento del número de publicaciones científicas que sugieren un papel revolucionario de este tipo de técnicas en la aplicación clínica contra el cáncer ha sido exponencial. Los resultados derivados de la utilización de técnicas como los microarrays de DNA en la lucha contra muchas enfermedades, en particular contra el cáncer, promueven:

- *El desciframiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad.* El análisis sistemático de los patrones de expresión génica contribuirá a un mejor conocimiento molecular de muchas enfermedades. Si se sabe con más precisión qué pasa, se tienen más armas para evitarlo o para combatirlo. El estudio de enfermedades de gran complejidad y que implican alteraciones genéticas, como el cáncer, parece adecuado abordarse a partir de una perspectiva global.
- *La identificación de nuevos genes marcadores.* En el caso particular de nuevos genes marcadores de cáncer, mediante el rastreo masivo de todos los genes que componen el genoma humano, analizando aquellos que muestren una expresión génica diferente entre células normales y tumorales. Determinados tumores pueden actualmente diagnosticarse en una fase temprana de la enfermedad gracias a métodos sencillos y no invasivos como es la detección en el suero sanguíneo de marcadores de cáncer específicos (por ej. el PSA, antígeno específico de próstata, para el cáncer de próstata).

A pesar de que el cáncer es una enfermedad compleja y multifactorial, cabe pensar que aun queden por descubrir marcadores específicos que permitan realizar un diagnóstico precoz y certero.

- *El descubrimiento de nuevas herramientas diagnósticas y de clasificación de tumores.* Hasta ahora, los tumores se han venido clasificando siguiendo criterios histológicos; esta categorización, aunque de gran valor, ha mostrado ser insuficiente: tumores que bajo el

microscopio presentan el mismo aspecto engloban procesos neoplásicos con distintas manifestaciones clínicas y de respuesta a fármacos.

Recientemente varias publicaciones en revistas de prestigio científico como Nature y Science han mostrado cómo la consideración de los datos moleculares aportados mediante el análisis sistemático de la expresión génica utilizando microarrays de DNA ha permitido diferenciar nuevas clases de tumores dentro de grupos ya conocidos, así como predecir la evolución clínica y la respuesta al tratamiento de determinados casos en los que los métodos tradicionales no alcanzaban a aportar tal información. Alizadeh *et al.* en “*Distinct types of diffuse B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*” (Nature, 2000), muestran cómo la utilización de un microarray especializado, el “linfocip”, permite distinguir, dentro de los tumores tradicionalmente clasificados como linfomas no-Hodgkin, dos distintos tipos de patología con pronóstico diferente. Golub *et al.* en “*Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*” (Science, 1999) publican cómo los datos moleculares basados en el comportamiento de un sólo gen no permiten distinguir entre dos tipos distintos de leucemia aguda, pero sin embargo pueden distinguirse de manera sólida cuando la predicción se basa en los niveles de expresión de 50 genes (seleccionados de entre los más de 6.000 representados en los arrays utilizados).

El cáncer de mama presenta manifestaciones clínicas muy diversas; Van't Veer *et al.*, en “*Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*” (Nature, 2002), utilizando chips de DNA, muestran cómo la aparición de un patrón específico de expresión génica en algunos casos de cáncer de mama se correlaciona con manifestaciones agresivas de esta enfermedad.

Hoy, muchos de los enfermos de un tipo de cáncer reciben un tratamiento que sólo beneficiará a unos pocos, pero todos sufren los efectos secundarios. Con la aplicación clínica de este tipo de técnicas se espera conocer el fármaco mejor para cada paciente y practicar una medicina más personalizada.

- *La identificación de nuevas dianas terapéuticas.* El conocimiento *a priori* de los fármacos a los que un particular tipo de cáncer no responde, no sólo evitará al paciente el sufrimiento de unos efectos secundarios innecesarios, si no que permitirá el empleo de tratamientos alternativos sin demora. Sin embargo urgen nuevos fármacos con potencial anticanceroso.

La técnica de los microarrays de DNA está contribuyendo a la identificación de nuevas dianas terapéuticas a través de dos vías fundamentalmente: 1) mediante el descubrimiento de nuevos genes como posibles candidatos a dianas terapéuticas y 2) contribuyendo al desciframiento de rutas bioquímicas implicadas en el proceso patológico que permitan rutas alternativas al tratamiento.

- *La aceleración del proceso de descubrimiento de fármacos.* Además del papel fundamental de los microarrays de DNA en el descubrimiento y validación de potenciales dianas terapéuticas, la aplicación de esta técnica también está introduciéndose en el proceso de validación de nuevas drogas. Desde la identificación de una putativa diana terapéutica hasta la disponibilidad en el mercado de nuevas drogas, queda por recorrer un proceso lento, difícil y caro. A pesar de los avances tecnológicos en distintas etapas del proceso de descubrimiento de fármacos, lleva varios años convertir una diana molecular en un producto en el mercado, y no siempre se consigue.

Hay ya numerosos ejemplos en la literatura que muestran como el empleo de los chips de DNA puede facilitar el estudio de propiedades fundamentales de las nuevas drogas,

como su eficacia, su mecanismo de acción o sus efectos tóxicos. Dentro del área de Toxicología, el rápido desarrollo de la Toxicogenómica, disciplina volcada en el entendimiento del efecto que a nivel celular y molecular provocan los compuestos químicos en los seres vivos, es un ejemplo de la importancia adquirida por este tipo de análisis genómicos como complemento a los estudios de toxicología clásica.

Una de las primeras señales de una célula ante un insulto tóxico consiste en alteraciones a nivel de mRNA. La comparación del perfil de expresión génica de células tratadas con un potencial nuevo fármaco con el que muestran células tratadas con sustancias tóxicas conocidas puede predecir el comportamiento del nuevo fármaco en cuanto a su toxicidad. Aunque aun está pendiente un conocimiento más profundo de las alteraciones que las toxinas inducen a nivel de expresión génica y la identificación de nuevos y fiables marcadores de toxicidad, el uso de este tipo de ensayos promete revolucionar la manera mediante la cual los compuestos son seleccionados para su ulterior desarrollo en fármacos. Furness en "*Analysis of gene and protein expression for drug mode of toxicity*" (Opin Drug Discov Devel 2002) revisa algunos ejemplos recientes de la aplicación de la tecnología de arrays al estudio de la toxicología.

De la misma manera, el efecto que los nuevos compuestos producen en células de ensayo puede evaluarse mediante estudios transcripcionales, es decir, analizando qué mRNAs -y en qué cantidad- expresan estas células, y comparándolo con lo que esas mismas células expresan al ser tratadas con compuestos ya caracterizados y de probada eficacia en el tratamiento.

ALGUNAS PERSPECTIVAS FUTURAS

Para que la tecnología de los microarrays de DNA llegue a ser verdaderamente revolucionaria, debe de convertirse en parte integral de las actividades diarias de un laboratorio clínico. Es probable que ésto ocurra muy pronto como método diagnóstico, en los próximos 3-10 años. Es esperable que, al igual que ocurrió con los ordenadores y otros dispositivos de alta tecnología, que comenzaron su andadura como instrumentos exóticos y caros, en poco tiempo se conviertan en herramientas de amplia disponibilidad, fáciles de usar, menos caras y más poderosas. Algunas cuestiones pendientes están camino de ser resueltas.

A pesar de su impresionante y rápido avance, dentro de esta tecnología queda espacio para mejoras técnicas. Además, la existencia de diferentes plataformas para el análisis de perfiles de expresión génica (el DNA inmovilizado sobre la superficie del microarray puede presentar distintas características: hay microarrays de oligonucleótidos, de cDNA, etc.) plantea cuestiones claves para la estandarización y portabilidad de la tecnología como son la consistencia, compatibilidad y reproducibilidad entre los diferentes métodos. No debe de infravalorarse la dificultad de cuestiones experimentales importantes como la recogida de muestras (el RNA es una molécula muy lábil, a menudo sólo se dispone de cantidades ínfimas de tejido, etc) y el diseño experimental.

Pero quizá el mayor desafío de la monitorización global de la expresión génica es el manejo adecuado de la ingente cantidad de datos procedentes de los experimentos con arrays. No tanto por su volumen, a menudo un número elevado de medidas facilita la visualización de determinados patrones que de otra manera no hubieran sido obvios o tenido suficiente significación estadística. La dificultad estriba en la integración sistemática y organizada de todos estos nuevos datos con los procedentes de otras fuentes y los ya existentes en la literatura científica, de manera que sea posible componer una información con significado biológico. De esta tarea se encargan los bioinformáticos y el tremendo esfuerzo humano dedicado a esta labor empieza a dar sus frutos.

Por otra parte, el éxito de los microarrays de DNA en conseguir una enorme cantidad de información en un solo experimento, ha animado a la comunidad científica a expandir la tecnología de los microarrays más allá de los chips de DNA y actualmente se está dedicando un gran esfuerzo al desarrollo de tecnologías análogas como los microarrays de proteínas, que aceleren la caracterización del proteoma. La transcripción del DNA genómico para producir mRNA es solo el primer paso en el proceso de síntesis de proteínas pero son éstas, las proteínas, las moléculas efectoras, las responsables directas de un específico fenotipo celular.

Aunque para la mayoría de los genes cambios en la abundancia de su mRNA están correlacionados con cambios en la expresión de sus productos génicos, esto no siempre es así puesto que existen otros procesos posteriores a la transcripción implicados en la modulación de la funcionalidad proteica. Pero a diferencia de lo que ocurre con los ácidos nucleicos (DNA y RNA), las proteínas entre si presentan distintas propiedades físico-químicas, lo que dificulta su estudio global y simultáneo; a pesar de la actual intensidad investigadora en este campo, son necesarios nuevos métodos de análisis masivo de proteínas que permitan el estudio sistemático de todo el proteoma de una célula.

En el futuro se espera que los arrays, posiblemente nanoarrays, de DNA, péptidos, proteínas, mRNAs, tejidos, células e incluso organismos multicelulares lleguen a ser habituales. El uso combinado de estos métodos junto con las herramientas computacionales, integración de bases de datos y avances en el análisis de secuencias e información hacen predecir nuevos avances en el entendimiento de la función y regulación de todos los genes y proteínas, desciframiento de los elementos celulares, mecanismos de enfermedad y nuevas vías para prevenir procesos celulares aberrantes y mejorar la sanidad humana y el bienestar social.

ALGUNAS REFERENCIAS

<http://nciarray.nci.nih.gov>

<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>

Alizadeh, A.A., *et al.* (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-511.

DeRisi J, *et al.* (1996): Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* 14: 457-460.

Furness L.M. (2002): Analysis of gene and protein expression for drug mode of toxicity. *Opin Drug Discov Devel* 5: 98-103.

Golub, T. R. *et al.* (1999): Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531-537.

Iyer, V.R. *et al.* (1999): The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83-7.

Liotta, L. and E. Petricoin (2000): Molecular profiling of human cancer. *Nature Reviews Genetics* 1: 48-56.

Lockhart, D.J. and E.A. Winzeler (2000): Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827-836.

Luo L. *et al.* (1999): Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nature Medicine* 5: 117-122.

Van't Veer *et al.* (2002): "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" *Nature*, 415: 530-536.

Zhang, L. *et al.* (1997): Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272.