

MICROARREGLOS DE ADN: APLICACIONES EN LA MICROBIOLOGÍA

DNA microarrays: applications in microbiology

EPISTEMUS
ISSN: 2007-8196 (electrónico)
ISSN: 2007-4530 (impresa)

Manuel Everardo Reyna Murrieta¹
José Francisco Valenzuela Sánchez²

Recibido: 12 de septiembre de 2019,
Aceptado: 30 de noviembre del 2019

Autor de Correspondencia:
Manuel Everardo Reyna Murrieta
Correo: manuel.reyna.mc18@estudiantes.ciad.mx

Resumen

Las tecnologías de microarreglos abren un gran abanico de posibilidades a la investigación a nivel molecular. Esta técnica comenzó a mediados de los 90 con los estudios de Schena y Lockhart quienes describieron por primera vez el desarrollo de un microarreglo para el monitoreo de la expresión de múltiples genes. En general, los microarreglos están basados en la hibridación de ácidos nucleicos. Permiten hacer análisis comparativos y simultáneos de cómo se van expresando cientos de genes en un solo experimento. Existen distintos tipos de microarreglos como los microarreglos en portaobjetos, microarreglos de alta densidad o Gene-Chip® y chips microelectrónicos. Los microarreglos en el ámbito de la microbiología tienen varias aplicaciones como perfiles de expresión génica, estudios de patogenicidad, resistencia bacteriana, farmacogenómica, diagnóstico y detección de microorganismos. Los microarreglos son una herramienta innovadora para la exploración de perfiles de expresión de genes.

Palabras clave: microarreglos, ADN, microbiología.

Abstract

Microarray technologies open a wide range of possibilities for research at the molecular level. This technique began in the mid-1990s with the studies of Schena and Lockhart who first described the development of a microarray for monitoring the expression of multiple genes. They allow comparative and simultaneous analysis of how hundreds of genes are expressed in a single assay. They allow comparative and simultaneous analysis of how hundreds of genes are expressed in a single experiment. There are different types of microarrays such as glass slide microarrays, high density microarrays or Gene-Chip® and microelectronic chips. Microarrays in the field of microbiology have several applications such as gene expression profiles, pathogenicity studies, bacterial resistance, pharmacogenomics, diagnosis and detection of microorganisms. The microarrays are an innovative tool for the exploration of gene expression profiles.

Keywords: microarray, DNA, microbiology.

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, México. Correo: manuel.reyna.mc18@estudiantes.ciad.mx

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, México. Correo: jose.valenzuela.mc18@estudiantes.ciad.mx



INTRODUCCIÓN

La investigación basada en técnicas moleculares ha ido en aumento durante los últimos años. Los grandes avances en tecnología han provocado el surgimiento de nuevas técnicas para la experimentación a nivel molecular. En el año de 1995 surge el primer estudio que utilizó la palabra "microarreglo". Dicha investigación mencionaba que era posible vigilar la expresión de muchos genes al mismo tiempo.

Un microarreglo (también denominado chip de ADN ó gene chip) consiste en múltiples fragmentos de ADN complementario (donde cada uno representa a un gen diferente) que se encuentran adheridos a un soporte (fabricado en plástico, sílice o vidrio). Hoy en día pueden incluir hasta 40,000 fragmentos distintos por cada centímetro cuadrado de espacio, de este modo podemos decir que disponen prácticamente de todo el genoma en estudio.

Las aplicaciones que han tenido los microarreglos son muy variadas, pero ha existido un énfasis muy importante en cuestiones médicas, biológicas, de alimentos, entre otras. Particularmente se ha despertado el interés de uso en especies bacterianas variadas. Con la ayuda de esta avanzada técnica se pueden obtener perfiles de expresión de distintos microorganismos, mecanismos de resistencia, efectos de fármacos y otras más aplicaciones.

Las tecnologías de microarreglos abren un gran abanico de posibilidades a la investigación a nivel molecular, por tanto, el conocimiento y la correcta utilización de estos procedimientos puede tener resultados muy benéficos para las industrias médicas y de la salud.

HISTORIA

Después de la primera descripción de la estructura de la ADN de doble hélice por Watson y Crick en 1953, el proceso de separar de la cadena de ADN pronto fue estudiado por técnicas con la electroforesis, el Southern Blot (1975) (Southern E, 1975), northern blot (1977), las técnicas de secuenciación de Sanger (1975) y de Gilbert (1977) y en 1986 la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Kary Mullis, así como las técnicas de transformación bacteriana sentaron las bases para poder realizar estudios a nivel de expresión de genes. Con los conocimientos alcanzados con las técnicas anteriormente mencionadas, el perfeccionamiento y adaptación de las mismas ayudaron para poder establecer uno de los proyectos más ambiciosos y relevantes del siglo pasado, el Proyecto Genoma (1990-2003) [1].

Los resultados obtenidos, permitieron sentar las bases para desarrollar una técnica con mayor poder de análisis y que en combinación con los avances se obtiene una herramienta de investigación y diagnóstico muy poderosa como son los arreglos de ácidos nucleicos y proteínas. Estas técnicas permiten conocer la razón por la que se produce una enfermedad o como una bacteria puede afectar nuestra salud e infectarnos. Una técnica muy importante es la de microarreglos, esta técnica nos permite conocer como el conjunto de genes de una bacteria van cambiando o afectando a través del tiempo y esto puede desencadenar en una respuesta que perjudica la salud de las personas. Los comienzos de esta tecnología pueden ubicarse a mediados de los 90 con los estudios de Schena y Lockhart. Schena y colaboradores describieron por primera





vez el desarrollo de un microarreglo para el monitoreo de la expresión de múltiples genes bacterianos [2].

Si bien los arreglos son herramientas que se han empleado desde hace algunos años, la innovación de esta nueva generación de arreglos radica en la miniaturización, a través de pequeños chips podemos detectar la presencia de genes. Otra innovación es el aumento en la densidad de secuencias que podemos encontrar por unidad de área del chip.

FUNDAMENTOS

Los microarreglos de ADN es una de las aplicaciones más importantes para la información obtenida de la secuenciación sistemática de los genomas completos [3].

Se les considera una poderosa herramienta de análisis en la expresión de genes debido al mayor número de secuencias que se pueden analizar por cada prueba, y además, tienen grandes ventajas sobre otras técnicas como la PCR convencional, la RT-PCR y la PCR en tiempo real, en las cuales sólo se pueden analizar un número muy limitado de genes de manera simultánea, debido a que se requiere montar un ensayo por cada gen que se quiere analizar [1].

En general, los microarreglos están basados en la hibridación de ácidos nucleicos, es decir, la unión de dos cadenas complementarias de ADN para formar una de doble cadena. Permiten hacer análisis comparativos y simultáneos de cómo se van expresando cientos de genes en un solo experimento.

Estas técnicas se basan en los llamados Chips de ADN, los cuales podemos describir como una gran cantidad de puntos de ADN que se unen a una superficie como puede ser cristal, plástico o sílice. En cada uno de estos puntos se encuentra una cantidad muy pequeña de una secuencia de ADN específica, y que sirve para poder hibridar una secuencia de un gen de interés, y el cual se va a detectar mediante la ayuda de una molécula fluorescente llamada fluoróforo. Debido a que tenemos una gran variedad de muestras, cada tipo de célula va a estar marcada por una molécula fluorescente diferente, y por tanto, los colores que se presenten durante el análisis serán distintas.

La lectura de cada uno de estos puntos va a indicarnos

qué genes se están expresando y cuáles no. Por supuesto que esta información obtenida debe ser analizada mediante sistemas de software específicamente diseñados para los datos obtenidos de los microarreglos [4].

Generalmente en los experimentos tenemos que colores rojos indican niveles de expresión, con el verde se identifica el control. Por tanto, coloraciones verde-amarillo muestran una expresión disminuida mientras que rojo-naranja indican expresión aumentada.

Aunque existen diferentes técnicas para la construcción de los microarreglos de ADN, el procedimiento básico para trabajar con ellos es el siguiente:

- ▶ Marcar la muestra del tejido a estudiar con una molécula fluorescente.
- ▶ Aislar el mRNA de las células de interés y proceder a copiarlo mediante una síntesis in vitro para pasarlo a cDNA (ADN complementario).
- ▶ Desnaturalizar (separar) el cDNA para obtener hebras simples a partir de dobles.
- ▶ Colocar dichas hebras en el microarreglo, donde serán atraídas por las hebras que están fijadas en él, provocando la unión para volver a formar una estructura de doble hélice que será similar a la del ADN. A este proceso se le conoce como hibridación.
- ▶ Lavar el microarreglo para quitar las hebras simples de nuestra muestra que no se hayan hibridado.
- ▶ Hacer el escaneo del microarreglo con un láser para poder cuantificar la fluorescencia de cada gen.

En general, la actividad de un gen se representa por el número de copias de mRNA de ese gen en una muestra de células. Si obtenemos bajos niveles de fluorescencia podemos decir que pocas copias se han hibridado y que, por tanto, el gen de interés tiene poca actividad en la célula. Por otra parte, cuando observamos niveles elevados de fluorescencia nos indica que el gen está teniendo mucha actividad [5].

Existen distintos tipos de microarreglos, los cuales tienen diferencias fundamentales en los soportes utilizados, por lo que se pueden catalogar como microarreglos en portaobjetos, microarreglos de alta densidad o Gene-Chip® y chips microelectrónicos [6].





Microarreglos en portaobjetos

Este tipo de microarreglos se diferencian de los microarreglos convencionales en tres aspectos: a) utilizan un portaobjetos de cristal o plástico como soporte; b) el marcado o señalización de las muestras se realiza mediante fluorescencia, y c) contienen un gran número de sondas. Este tipo de microarreglos fue introducido en 1995 por el grupo de P.O. Brown en la Universidad de Stanford [7]. Las ventajas de este sistema es que la hibridación tiene lugar en una cámara de hibridación pequeña, de modo que se trabaja con volúmenes mucho más pequeños y la concentración relativa de las sondas es mayor, puede sintetizarse en el propio laboratorio y sobre todo que la utilización de la fluorescencia como sistema de marcado permite hibridar en un mismo microarreglo varias muestras conjuntamente (por ejemplo, control y problema).

Gen-Chip®

Un tipo particular de microarreglos son los producidos por *Affymetrix*, una compañía que ha ideado y patentado una tecnología que permite de manera simultánea la síntesis y la impresión de las sondas moleculares directamente en la fase sólida. Estos microarreglos contienen más de 50.000 sondas y actualmente son los que poseen mayor número de sondas y mayor densidad. La ventaja de este sistema es que es muy reproducible, ya que las condiciones están muy estandarizadas. Los inconvenientes principales son que el análisis con este tipo de microarreglos requiere el uso de escáneres y software específicos que únicamente provee la propia compañía, y que estos microarreglos no contienen las secuencias completas de los genes sino fragmentos internos de 25 nucleótidos, de modo que si la muestra analizada no presenta una homología del 100% pueden aparecer problemas a la hora de la hibridación.

Chips microelectrónicos

Los chips microelectrónicos o Nanochip son uno de los formatos más novedosos dentro de los microarreglos. Su desarrollo es el resultado de la combinación de varios avances en el campo de la biología molecular y las técnicas de microfabricación de semiconductores. En lugar de una

membrana o un portaobjetos este tipo de microarreglos consiste en un conjunto de electrodos cubiertos por una fina capa de agarosa que contiene acoplados motivos de afinidad que permiten la inmovilización de las sondas mediante el sistema llamado biotina-estreptavidina. La incorporación de campos eléctricos controlables dota de un nuevo grado de control del sistema a la hora de depositar tanto las sondas como las muestras. A diferencia del resto de los microarreglos, en los que la hibridación es un proceso pasivo y aleatorio, en el caso de los chips microelectrónicos se genera un campo eléctrico que dirige activamente la muestra, incrementando su concentración sobre las sondas, y por tanto, aumentando la efectividad de la hibridación. Además, si tras el proceso de hibridación se invierte la polaridad se elimina el exceso de muestra y puede procesarse una nueva [7].

APLICACIONES DE LOS MICROARREGLOS

Cada uno de los tipos de microarreglos va a ofrecer ventajas y desventajas al momento de aplicarlo en un trabajo de investigación. En microbiología se han utilizado para caracterizar cepas (variantes) de microorganismos y establecer la presencia de factores de virulencia en bacterias de interés clínico [8]. Además, se ha investigado la respuesta de la célula hospedadora frente a la acción del microorganismo.

Tradicionalmente en la microbiología se han utilizado medios de cultivos, tinciones o pruebas bioquímicas para poder identificar a la mayoría de las especies bacterianas. Algunos de estos tipos de ensayos requieren un largo periodo de tiempo antes de poder obtener resultados definitivos, por lo que se ha buscado desarrollar alternativas para poder detectar características moleculares de las bacterias [6].

Inicialmente los métodos de identificación bacteriana se basaban en hibridar fragmentos de ADN marcados. Esto generaba un problema ya que existía un bajo número de estos microorganismos que se querían detectar. Cuando surgieron las técnicas de PCR se logró suplir esta limitante



debido a que se tenía un sistema de amplificación de los genes. Si bien esto ayudó a poder identificar poblaciones bacterianas también mostró otras limitaciones: en primer lugar, podrían existir mutaciones en las regiones del ADN que fueran reconocidas por los primers (iniciadores) que podrían conducir a falsos negativos. Debido a esto, muchas veces se volvía necesario secuenciar el producto que se obtenía por amplificación para poder identificar dichas mutaciones.

Con la llegada de los microarreglos de ADN se solucionaron muchas de estas cuestiones. Esta técnica permitió la detección de genes específicos o ciertas regiones de un microorganismo [6].

Podemos resumir las aplicaciones de los microarreglos en el ámbito de la microbiología en los siguientes campos:

Perfiles de expresión génica

Es la principal aplicación para la que se han usado los microarreglos en la microbiología. De esta manera se generan perfiles transcripcionales o de expresión genética. Para cada gen o región de ellos se puede medir la actividad transcripcional bajo ciertas condiciones, y pudiéndose comparar con otras distintas [9]. Debido a este tipo de experimentos se ha llegado a comprender de mejor manera como se dan las respuestas frente a los distintos cambios ambientales y la expresión génica que muestran los microorganismos.

Estudios de patogenicidad

Cuando se tienen perfiles de expresión bacteriana obtenidos bajo condiciones que simulan las del hospedador, se obtiene información sobre las interacciones metabólicas que se generan, además de las rutas que sigue



una infección microbiana. Es por ello que el énfasis de los estudios en bacterias patógenas es el poder identificar aquellos genes bacterianos que se van a expresar específicamente durante los períodos de infección, ya sean genes que permitan al microorganismo una adaptación a las condiciones que le brinda su hospedador, o que la bacteria invasora active genes que codifiquen para factores de virulencia. [9 y 10].

Resistencia Bacteriana

Los estudios de genotipificación bacteriana de la resistencia a antibióticos mediante los microarreglos de ADN son escasos, pero esta técnica ha sido probada en aislamientos clínicos de bacterias resistentes a distintos fármacos. Uno de los más comunes en bacterias formadoras de β -lactamasas. En estos ensayos se utilizan oligonucleótidos inmovilizados,

y lo que se busca encontrar son polimorfismos de genes (es decir, variaciones en algún lugar de la secuencia del ADN). Por tanto, a partir de muestras de ADN de aislamientos clínicos se hace genotipificación para conocer los genes que están causando resistencia a los antibióticos en las bacterias [4].

Farmacogenómica

Cuando se da la inhibición de un determinado proceso celular por la acción de un fármaco puede dar como resultado que se activen mecanismos dentro de la célula, lo que provoca cambios en el perfil de expresión celular. Estudiar estos cambios mediante microarreglos de ADN puede revelar información sobre la manera de actuar de los fármacos o de los inhibidores. Este tipo de ensayos han sido probados en distintas bacterias y ayudan a definir nuevas medidas terapéuticas, además de colaborar con la síntesis de nuevos compuestos [9].

Herramienta de diagnóstico y detección de microorganismos

El diagnóstico de enfermedades se ha realizado mediante microarreglos de ADN, que permiten el estudio de cambios simples en la secuencia de ADN y mutaciones en genes complejos que se asocian a una enfermedad concreta. La identificación de microorganismos patógenos (como las bacterias) mediante esta técnica es de gran utilidad en diversas patologías infecciosas. La ventaja es que pueden emplearse en la detección simultánea de un amplio número de microorganismos, lo que disminuye los tiempos y costos de la enfermedad, además de brindar mejores diagnósticos y con ello, poder administrar los tratamientos más adecuados al padecimiento [11].





Ventajas y desventajas de la utilización de los microarreglos

La principal ventaja de esta metodología es la posibilidad de acoplamiento simultánea de un gran número de sondas, por lo que permite detectar a la vez un amplio número de microorganismos (bacterias, virus, parásitos y hongos). Además, permite no sólo la identificación del microorganismo, sino también el análisis del genotipo de resistencia a los antibióticos y la presencia de factores de patogenicidad, mediante detección de genes específicos o cambios en su genoma. Sin embargo, existe una serie de desventajas que probablemente en el futuro podrán ser resueltas. Una de ellas es la baja sensibilidad, que en la actualidad hace difícil la utilización de esta metodología para la detección directa del microorganismo en el producto patológico, a no ser que se incorpore un paso previo de duplicación del genoma. No obstante, cuando los microarreglos ya sean miniaturizados, su sensibilidad probablemente aumentará, por lo que, en un futuro, y gracias a la nanobiotecnología, es probable que pueda detectarse el ADN o ARN directamente de la muestra sin amplificación previa.

Otra desventaja importante es que la detección de un gen de resistencia no significa que este expresando o este activo ese gen de resistencia, por lo que además de detectar la presencia del gen deberíamos detectar la expresión de éste mediante análisis del ARN mensajero (ARNm) [12]. Desde el punto de vista de la detección de la resistencia a los antibióticos de un microorganismo determinado directamente del producto patológico comporta también una serie de inconvenientes, como son:

La gran cantidad de mecanismos de resistencia que existen para un antibiótico determinado y la necesidad de contemplarlos todos ellos en el microarreglo de ADN.

Para algunos mecanismos es necesario determinar si el gen es funcional o está activo en la bacteria [13].

La aparición de nuevos mecanismos de resistencia no contemplados en el microarreglo.

Si el producto patológico corresponde a una zona del cuerpo humano que presenta una población de bacterias no dañinas, ésta puede interferir con la detección, ya que el mismo mecanismo de resistencia puede estar presente en algunas de las bacterias que constituyen este microbiota.

CONCLUSIONES

Los avances tecnológicos suponen un reto en el desarrollo de la Microbiología Clínica. Los microarreglos es una herramienta innovadora para la exploración de perfiles de expresión y para la búsqueda de diferencias en el contenido genético en genomas completos. Esta técnica debe ser aplicada no sólo en la mejora de la eficiencia diagnóstica sino también en los procesos del propio laboratorio y los que trascienden al propio individuo, sano o enfermo. El continuo desarrollo tecnológico hará posible próximamente la mejora de la técnica de microarreglos de ADN, haciéndola mucho más efectiva y pudiendo responder con más eficacia a cuestiones a escala genómica, o lo que es lo mismo, del organismo completo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Medina and F. Espinosa, "Microarreglos: Tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana", *Aler, Asma e Inmgia Pediás.*, vol. 18, pp. 52-59, 2009.
- [2] M. Schena et al., "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray," *Science*, vol. 270, pp. 467-470, 1995.
- [3] J. Ramírez et al., "Microarreglos de DNA," *Mensaje Bioquímico*, vol. 27, pp. 97-120, 2003.
- [4] U. Garza, J. Silva and E. Romero, "Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana," *Salud Publica Mex.*, vol. 51, pp. 439-446, 2009.
- [5] M. Rivas, J. Sánchez and J. De Las Rivas, "Estructura y análisis de microarrays," *BEIO*, vol. 21(2), pp. 10-15, 2005.
- [6] A. Doménech, and J. Vilab, "Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica," *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, vol. 22(1), pp. 46-54, 2004.
- [7] M. Schena and R. Davis, "Technology. standards for microarray research," *Microarray biochip technology*, pp.1-18, 1995.
- [8] V. Chizhikov et al., "Microarray analysis of microbial virulence factors," *Appl Environ Microbiol.*, vol. 67, pp. 3258-3263, 2001.
- [9] Aguado, M. (2007). Microarrays de adn en Microbiología DNA microarrays in Microbiology. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 125.
- [10] G. Schoolnik, "Functional and comparative genomics of pathogenic bacteria," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 5, pp. 20-26, 2002.
- [11] M. López, P. Mayorquin and M. Vega, "Aplicación de los microarrays y biochips en salud humana," *Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica.*, vol 1, pp 10-15, 2005.
- [12] L. Van Doorn et al., "Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the Helicobacter pylori 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance," *Antimicrob Agents Chemother.*, vol. 43, pp. 1779-1782, 1999.
- [13] D. Llame et al., "Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays," *Antimicrob Agents Chemother.*, vol. 47, pp. 3290-3295, 2003.

