

COM LA BIOLOGIA MOLECULAR POT MILLORAR EL DIAGNÒSTIC DE LES NEOPLÀSIES

EINES MOLECULARS APLICABLES AL DIAGNÒSTIC DE TUMORS

Escrit per:

Sílvia Beà i Pedro Jares

Unitat de Genòmica - IDIBAPS

Hospital Clínic de Barcelona

A l'abril del 2003 es va completar el Projecte Genoma Humà (PGH) amb l'obtenció de la seqüència completa del genoma humà, accessible per a tota la comunitat científica. Sens dubte aquesta va ser una fita sense precedents en la història de les ciències biomèdiques. L'èxit en la seqüenciació del genoma humà i d'altres espècies va generar una quantitat increïble d'informació endinsant-nos en l'anomenada era del post genoma, en la qual l'estudi dels productes d'aquests gens i la seva funció són un dels reptes a assolir. L'aplicació de noves eines moleculars és el que fa avançar aquest projecte, alhora que permet també conèixer els mecanismes de desenvolupament de les cèl·lules neoplàsiques. Aquest coneixement es pot transferir amb certa rapidesa a la pràctica clínica, particularment per ajudar en el diagnòstic i poder establir millors criteris pronòstics. També ens permet el reconeixement de diferents malalties que els criteris morfològics o fenotípics no poden distingir.

Les cèl·lules neoplàsiques es caracteritzen per ser genèticament inestables. Aquesta inestabilitat pot assumir diferents formes, per exemple, en la dificultat d'algunes cèl·lules de mantenir la integritat dels seus cromosomes, cosa que comporta anomalies en el seu cariotip.



© Alfred Pasieka

Algunes noves eines de diagnòstic molecular i citogenètica com la Hibridació *in situ* fluorescent (FISH), FISH Multicolor, la Hibridació Genòmica Comparada (CGH) i els microarrays, possibiliten l'estudi d'aquestes anomalies de forma molt més acurada.

Tècniques d'estudi de les alteracions cromosòmiques

Les tècniques emprades per l'estudi de les alteracions cromosòmiques han anat canviant i essent modificades al llarg del temps. En línies generals i per ordre cronològic, podem diferenciar 3 tècniques bàsiques: la citogenètica convencional, la hibridació *in situ* fluorescent (incloent el pintat cromosòmic), el FISH multicolor i la Hibridació Genòmica Comparada (CGH).

- Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La tècnica de FISH permet la detecció i localització de seqüències específiques de DNA sobre cromosomes metafàsics i nuclis interfàsics, utilitzant sondes específiques marcades amb fluorescència. Depenent del tipus d'alteració que volem estudiar, podem utilitzar diferents tipus de sondes: les sondes centromèriques, que hibriden específicament amb el centròmer de cada cromosoma donant un senyal gran i que s'utilitzen per detectar alteracions cromosòmiques numèriques (monosomies i trisomies), o bé les sondes de seqüència única (o sondes específiques de locus), els nivells de detecció de les quals varien entre 1 kb i 300 kb. Aquestes darreres s'utilitzen per detectar tant alteracions numèriques com estructurals d'un locus concret (síndromes de microdeleccions i reorganització d'oncogens). Posteriorment, es van desenvolupar les sondes de pintat cromosòmic, que hibriden amb tot un cromosoma determinat. Aquestes s'utilitzen per identificar reordenaments estructurals que donen lloc a cromosomes marcadors i reorganitzacions.

- FISH Multicolor (M-FISH)

La FISH Multicolor ha revolucionat el món de la citogenètica en els darrers anys, permetent la identificació dels 24 cromosomes humans mitjançant un marcatge fluorescent que els dona un color específic i diferencial a cadascun. L'M-FISH es basa en la hibridació conjunta de 24 sondes de pintat cromosòmic sobre metafases tumorals. Els 24 colors s'obtenen de la combinació de 5 fluorocroms diferents, i el resultat final és una imatge en la qual cada parella de cromosomes és d'un color

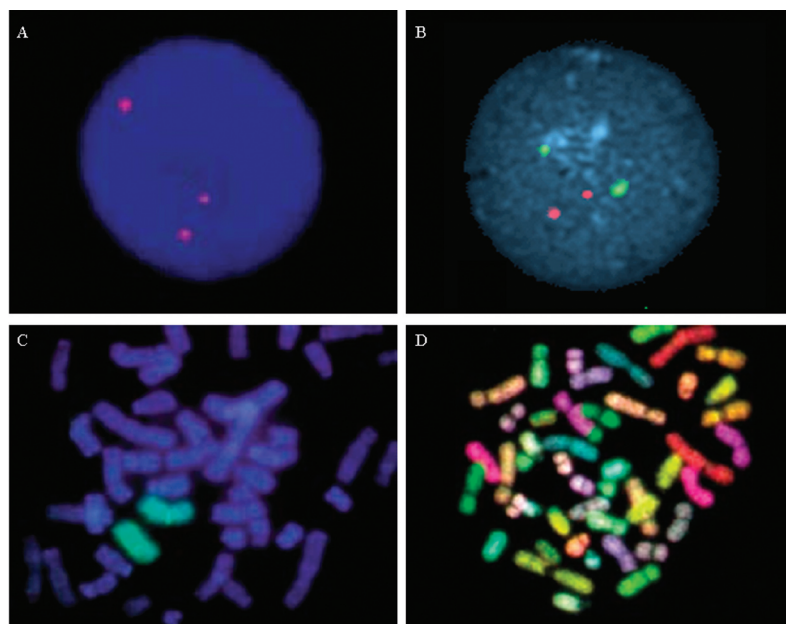


Figura 1.
 A) FISH sobre nuclis interfàsics amb sonda del centròmer del cromosoma 12.
 B) FISH sobre nuclis interfàsics amb sonda locus específica de *P53* a 17p13 (vermell) i del centròmer del cromosoma 17 (verd).
 C) FISH amb sonda de pintat del cromosoma 8.
 D) M-FISH

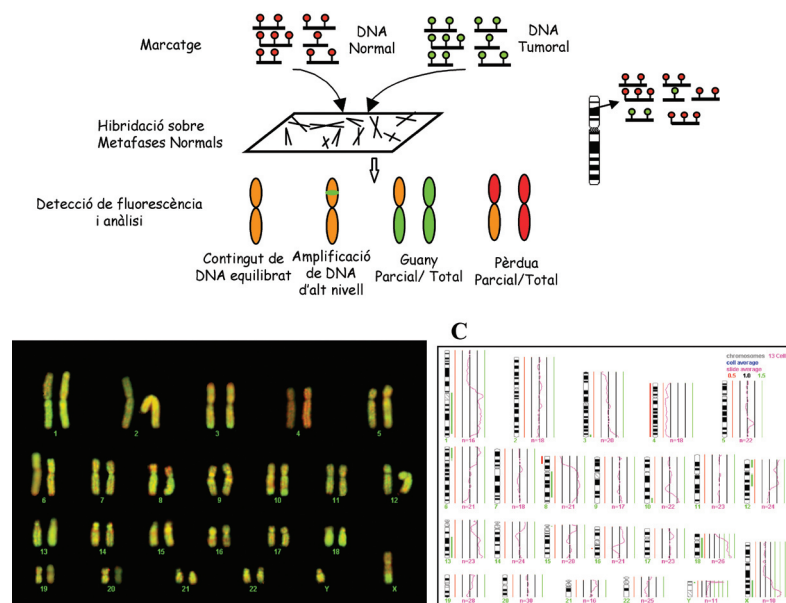


Figura 2.
 A) Esquema de la tècnica CGH. El DNA tumoral i normal es marca amb diferents fluorocroms (p.e. tumor amb verd i normal amb vermell), i s'hibriden sobre extensions metafàsiques normals.
 B) Imatge d'una CGH en la qual el DNA tumoral està marcat amb fluorocrom verd i el normal amb vermell, per tant, els guany cromosòmics del tumor es detecten amb verd i les pèrdues amb vermell.
 C) Perfil dels cromosomes corresponents a la hibridació de la CGH anterior, les línies de la dreta del cromosoma (barra verda) representen els guany i les línies de l'esquerra (barra vermella) representen les pèrdues cromosòmiques.

diferent. L'M-FISH pot ser utilitzat per a la identificació d'anormalitats cromosòmiques com les translocacions críptiques, duplicacions i determinats tipus d'amplificacions i delecions. Aquesta tècnica suposa un avantatge considerable respecte a la citogenètica convencional utilitzada fins ara, la qual identificava cada cromosoma mitjançant un patró de bandes. El principal inconvenient és que es necessiten cèl·lules tumorals en divisió, de manera que els tumors poc proliferatius no poden estudiar-se mitjançant M-FISH. Una altra de les limitacions d'aquesta tècnica és que no dona informació sobre canvis intracromosòmics (Figura 1).

- Hibridació Genòmica Comparada (CGH)

La Hibridació Genòmica Comparada (CGH) és una tècnica de garbell que permet detectar guanys i pèrdues de material en tot el genoma en un únic experiment d'hibridació a partir de DNA extret del tumor. La CGH es fonamenta en un procés d'hibridació competitiva entre DNA tumoral i DNA normal marcats amb fluorocroms diferents sobre metafases normals, i la posterior quantificació de la diferència d'intensitats d'aquests fluorocroms. Així, si el tumor té un guany en una regió cromosòmica dominarà la seva fluorescència respecte

artificials de bacteris, etc. (Figura 3). Els Microarrays, igual que les tècniques descrites anteriorment, es basen en la hibridació complementària entre cadenes d'àcids nucleics per formar molècules de doble cadena. La mostra sota estudi (DNA, RNA o cDNA) és marcada utilitzant radioactivitat o fluorescència i es diposita sobre la superfície de l'array per a la seva hibridació. Després d'una sèrie de rentats, el complex mostra-sonda es manté unit sobre la matriu del microarray. La quantitat de mostra que hagi hibridat amb la sonda es quantifica mitjançant sistemes de detecció fluorescent (Figura 4). Aquesta tecnologia permet l'anàlisi simultània de milers de variables en una sola mostra de forma ràpida i eficient. En l'actualitat els científics fan servir diferents plataformes d'arrays de DNA que es diferencien en la naturalesa de les molècules d'àcid nucleic immobilitzades a la matriu per donar respostes a diferents qüestions d'escala genòmica.

Un exemple d'aquests arrays de DNA són el BACarrays, els quals suposen una millora considerable a nivell de resolució respecte la CGH. La CGH detecta aquests guanys i pèrdues amb una resolució limitada, de manera que no és possible detectar el canvis que impliquin segments inferiors a 7-10 Mb. Els BACarrays detecten aquests canvis, també per hibridació competitiva amb marcatge diferencial, i ofereixen una quantificació del canvi del nombre de còpies de DNA per a cada locus, augmentant de manera considerable la resolució.

La transcriptòmica i els arrays d'expressió gènica

El conjunt d'RNA missatger que s'expressa en una cèl·lula en un moment determinat és el transcriptoma de la cèl·lula i és específic del tipus de cèl·lula i del seu estat. El patró d'expressió dels RNA missatgers d'una cèl·lula determina el fenotip, la funció i la seva resposta a canvis en el medi ambient o estímuls externs.

La utilització dels microarrays en l'estudi del transcriptoma de les cèl·lules permet analitzar les diferències en l'expressió gènica en diferents condicions (teixit normal versus teixit patològic, resposta al tractament, etc.) i per tant poden ajudar a entendre les funcions cel·lulars, els mecanismes de regulació i els patrons bioquímics de la cèl·lula neoplàsica.

Es poden desenvolupar arrays 'a la carta' que continguin els gens associats al desenvolupament o progressió de determinats tumors.

Per tant l'objectiu final és poder identificar dianes moleculars les quals es puguin utilitzar per a dissenyar tractaments més adequats i eficaços, avançant cap a un futur en el qual cada pacient gaudirà d'un tractament personalitzat, atès que la malaltia de cada persona és única i per tant cada malaltia ha de ser tractada de forma individualitzada. En resum, es tractaria d'una medicina que analitzés molecularment les malalties i oferís tractaments dirigits a les bases moleculars de la malaltia.

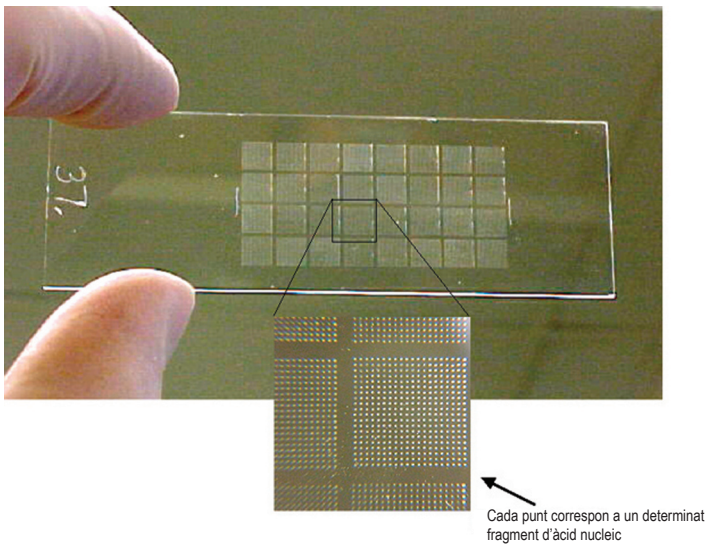


Figura 3. Visió augmentada d'un microarray de DNA.

al DNA normal, i si té una pèrdua, a l'inrevés (Figura 2). La CGH és una tècnica molt valuosa per a identificar guanys de regions que inclouen oncogens o pèrdues de parts del genoma que inclouen gens supressors de tumors.

Què són els Microarrays?

Els Microarrays de DNA consisteixen en una matriu sòlida sobre la qual se situen de forma ordenada milers de fragments de DNA, que poden ser cDNA, oligonucleòtids, cromosomes

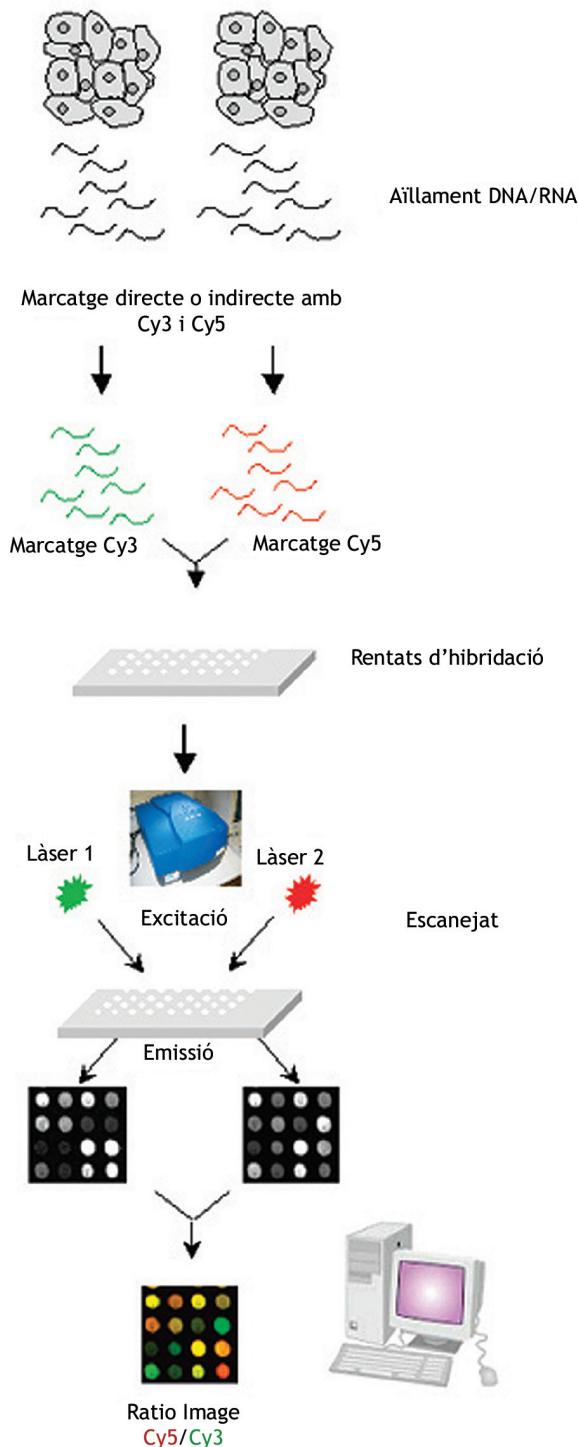


Figura 4. Esquema de la tècnica de Microarrays



Sílvia Beà és Llicenciada en Biologia per la Universitat Autònoma de Barcelona i Doctora en Biologia per la Universitat de Barcelona amb el treball "Alteracions cromosòmiques i moleculars en limfomes No-Hodkin humans i el seu significat clínic i biològic", pel qual obtingué el Premi Extraordinari de Doctorat corresponent a l'any acadèmic 2002/03. Durant la realització de la tesi doctoral va fer una estada al National Cancer Institute-NIH (Bethesda, MD, USA) on realitzà estudis de transfecció d'oncogens en línies cel·lulars hematològiques.

Ha publicat més de 20 articles en revistes científiques. En l'actualitat treballa al laboratori de Patologia Molecular de l'IDIBAPS- Hospital Clínic, on dirigeix la seva pròpia línia de recerca sobre l'estudi de les alteracions moleculars en els limfomes humans i la relació d'aquestes alteracions amb el pronòstic dels malalts.

Les seves àrees d'interès són el desenvolupament de noves tecnologies relacionades amb la citogenètica, com per exemple la CGH i els BAC arrays.



Pedro Jares és llicenciat en Ciències Biològiques i doctor per la Universitat de Barcelona pel treball "Activació i inactivació de gens reguladors del cicle cel·lular en el desenvolupament i progressió de neoplàsies humanes (ciclina D1, Retinoblastoma, p16 i p21)" pel qual va rebre el Premi Extraordinari de Doctorat corresponent a l'any acadèmic 1996/97. Va cursar la seva formació postdoctoral al Departament de Bioquímica de la Universitat de Dundee (Scotland) al grup Chromosome Replication Research dirigit pel Dr. J. Blow, on va treballar en l'estudi del control de l'inici de la replicació del DNA. Posteriorment, va fer una estada al Advanced Technology Center del NCI/NIH (Gaithersburg, MD, USA) on va entrar en contacte amb la tecnologia dels microarrays de DNA. El 2002 es va incorporar com a responsable de la Unitat de Genòmica de l'IDIBAPS-Hospital Clínic de Barcelona.

Les seves àrees d'interès són el desenvolupament de noves tecnologies relacionades amb els microarrays de DNA i les seves aplicacions, sense deixar de banda l'estudi de les alteracions moleculars implicades en el processos neoplàsics, principalment hematològics.

Actualment treballa en l'estudi del paper de les alteracions dels gens implicats en el control de la replicació del DNA en la gènesi i progressió de tumors humans, i en la identificació i caracterització de nous gens supressors de tumors mitjançant microarrays de DNA.