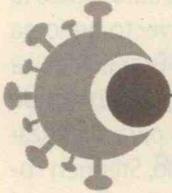


# Microarreglos y PCR cuantitativa en virología



*Juan Carlos Zapata. Bact. MSc. Institute of human virology,  
U of Maryland.*

## Introducción

Durante las últimas dos décadas se han desarrollado alternativas de tratamiento altamente efectivas contra las enfermedades infecciosas y se han hecho avances en la detección de sus agentes causales. Estos avances se han enfocado, principalmente, en el diseño de sondas para la detección estructural de agentes patógenos (antígenos y ácidos nucleicos) y se han producido gracias al conocimiento obtenido de la secuenciación de varios microorganismos y su estudio a nivel estructural.

Los nuevos métodos permiten el estudio de la expresión de miles de genes en una sola reacción, y de esta manera diferenciar agentes estrechamente relacionados o determinar los patrones moleculares de la interacción célula agente infeccioso. Tales patrones se conocen como "marcadores biológicos" y con ellos se puede confirmar la exposición al agente infeccioso –lo cual tiene importancia clínica- y también se pueden estudiar las redes bio-moleculares propias de cada tipo de infección – lo cual tiene importancia investigativa-.

En este capítulo, se describen los conceptos básicos de las técnicas de microarreglos y Reacción en Cadena de la Polimerasa

---

<sup>1</sup> Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, MD, 21201, USA



en tiempo real (comocida también como PCR cuantitativa o qPCR), y los usos potenciales en el campo de la virología. Cabe anotar que los mismos principios son aplicables al estudio de otros agente infecciosos.

A finales de 1980 se hicieron grandes progresos en el área de la biología molecular: nació la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se automatizó la técnica de secuenciación de ADN y se debatió el comienzo del proyecto genoma humano. En el Reino Unido, Edwin Southern encontró la manera de usar la técnica de impresión a chorro, (del inglés inkjet) empleada en las impresoras, en donde se utilizan cuatro nucleótidos en lugar de los cuatro colores básicos para sintetizar secuencias oligonucleótidas en laminillas de vidrio. Al mismo tiempo, Stephen Fodor, en Estados Unidos, utilizó la técnica de tinción usada en fotopoligrafía con el mismo propósito. Estas dos técnicas revolucionaron la genómica funcional con el desarrollo de una nueva tecnología llamada "Microarreglos".

A partir de esta innovación, Fodor fundó la compañía Affymetrix, que produce microarreglos de oligonucleótidos y microarreglos peptídicos. Al mismo tiempo, en Inglaterra, Souther fund oxford Gene Technologies; ambas compañías comercializan actualmente microarreglos que cubren el genoma humano en su totalidad.

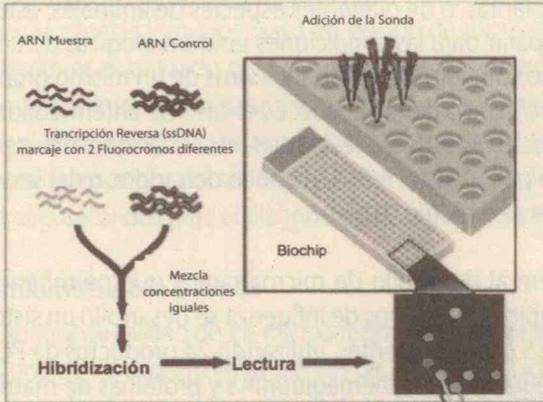
Por su parte Patrick Brown propuso el uso de pequeñas secuencias de ADN pre-sintetizadas, en lugar de sintetizarlas en laminillas. Utilizando esta variante y en asocio con Mark Schena, publicaron el primer estudio de expresión de un genoma completo y acuñaron la palabra "Microarreglo" (Microarray, en inglés). Hoy existen una amplia gama de microarreglos comerciales de alta calidad, confiables y lo suficientemente económicos para ser utilizados en laboratorios de investigación y de diagnóstico de rutina.

## Microarreglos

La palabra microarreglo se deriva del griego mikros (pequeño) y del francés arrai (orden, arreglo). Un arreglo de ADN consta de un sustrato sólido (una membrana de nylon, una laminilla de vidrio o de plástico) al cual se han adherido segmentos de ADN de cadena simple (ssADN), llamados sondas, que son secuencias de diferentes genes. Estas sondas pueden ser oligonucleótidos sintéticos o amplicones producto de PCR. Al sitio donde se fija la sonda se le conoce con el nombre de Biochip. Si el número de sondas diferentes presentes en el sitio es mayor de mil, el biochip se conoce como "arreglo de alta densidad" o "microarreglo".

Los biochips se producen según las necesidades del usuario; por ejemplo, si el objetivo es detectar la variación genotípica de un virus en una muestra, con diferentes subtipos

genéticos, el arreglo tendrá todas las variaciones genéticas específicas. Pero si lo que se quiere es entender la funcionalidad de un gen en particular, el arreglo tendrá secuencias que representan los genes involucrados en esa misma vía metabólica.



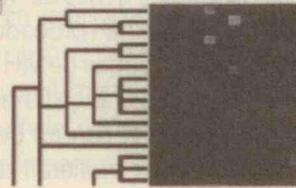
Técnica de microarreglos modificado de:  
DNA Microarray hybridization analysis  
Craig A. Cummings and David A.  
Relaman. 2000.

El índice  $Cy3/Cy5$  representa la cantidad  
de ARN presente en la muestra

Análisis de resultados y clasificación  
jerárquica. El verde representa los genes  
inhibidos y el rojo los genes expresados

Análisis de Imagen

Cy3	Cy5	$\frac{Cy5}{Cy3}$	$\log_2 \frac{Cy5}{Cy3}$
200	10000	50.00	5.64
4800	4800	1.00	0.00
9000	300	0.03	-4.91



Para la técnica de microarreglos, todas las muestras a evaluar se deben convertir en ssADN; así, si se quiere detectar la transcripción de un gen (mARN), o la presencia de un virus cuyo genoma es ARN, debemos utilizar una transcriptasa reversa para convertir este ARN en cADN. Luego se marcan el cADN y el ssADN sonda con fluorocromos diferentes o con marcadores radiactivos, y se mezclan bajo condiciones específicas de temperatura. Después de un lavado se detectan las cadenas que se hayan hibridado y se calcula el índice muestra/sonda. Esta medición permite cuantificar la presencia de una región génica determinada que indica la presencia de un agente determinado o la transcripción de un gen particular. La gran ventaja de esta técnica es que permite el estudio de miles de genes (o miles de agentes) en una misma reacción y, de esta manera, se puede obtener una idea general de las interacciones bio-moleculares que se dan frente a un estímulo determinado (o hacer un diagnóstico específico entre miles de posibilidades, en una sola reacción).

### Usos potenciales de los microarreglos en virología:

Los usos mayores de los microarreglos en virología se podrían agrupar en tres grandes categorías: en el diagnóstico, la tipificación y en la investigación básica.

En primer lugar, en el diagnóstico, se pueden plantear los siguientes escenarios: 1) diagnóstico general; esto es, determinar el tipo de virus que afecta a un individuo en un momento dado, entre los múltiples agentes virales posibles según la especie de individuo afectado o el sitio geográfico. Esto es, se pueden fabricar biochips que detectan virus del hombre, o de plantas, o de diferentes especies de animales; estos biochips también se pueden preparar para las condiciones epidemiológicas de una región determinada. 2) Diagnóstico diferencial entre varios virus de un mismo grupo o familia, asociados con un cuadro clínico determinado. Es el caso de enfermedades vesiculares, exánthemáticas, del tracto digestivo, o leucemias, etc. 3) Diagnóstico para una situación determinada como puede ser el caso del banco de sangre, o del servicio de trasplantes, o el servicio de neurología, etc.

El caso de la tipificación se refiere al desarrollo de microarreglos que permiten la subtificación molecular. Por ejemplo, para el virus de influenza se desarrolló un sistema que permite la tipificación de 5 cepas diferentes, utilizando 24 productos de PCR provenientes de los genes de neuraminidasa, hemaglutinina y proteínas de matriz. De igual manera, se han probado con éxito microarreglos para tipificar 47 genotipos de rotavirus y genotipos de VIH resistentes a drogas antiretrovirales (este último es el primer biochip comercial usado en virología clínica). Adicionalmente se pueden usar biochips para el control de lotes de vacunas a fin de asegurar la ausencia de cepas mutantes que pudieran causar enfermedad.

En el campo de la investigación básica las posibilidades son ilimitadas y hasta el momento apenas se inicia su aplicación. El estudio de los patrones de expresión génica ha sido uno de los temas de mayor impacto analizados por esta técnica; y se ha mirado no solo la expresión de genes virales sino también la respuesta de las células a la exposición viral o al subsecuente tratamiento antiviral. Uno de los modelos es la expresión de genes virales del cytomegalovirus humano (HCMV), *in vitro*, después del tratamiento con ciclohexamida o ganciclovir. Además, se han hecho trabajos para explorar el fenómeno de latencia en miembros de la familia de los herpesvirus.

También se han explorado los patrones de expresión génica celular después de la exposición, *in vivo* e *in vitro*, a virus respiratorios y arenavirus. En estos ensayos se han evidenciado patrones de expresión específicos de virus que, eventualmente, podrían servir como marcadores tempranos de infección, o también conocidos como "marcadores biológicos". En otras palabras, cada virus induce un patrón de expresión específico en la célula infectada pocas horas después del contacto (a manera de una huella digital -fingerprint-), el cual puede ser utilizado para un diagnóstico precoz (aún sin que hayan aparecido los síntomas). En estos trabajos se han utilizado microarreglos caseros -con secuencias para analizar hasta 8000 genes- y también microarreglos comerciales que incluyen todo el genoma humano (Affimetrix).

## Microarreglos de proteínas

Otra de las tecnologías en desarrollo para el diagnóstico viral son los microarreglos de proteínas. Estos se preparan con antígenos virales o anticuerpos específicos unidos a un soporte plástico (biochips análogos a los microarreglos de ADN). En otras palabras, se trata de una especie inmunoensayo en versión de microarreglo. Uno de estos microarreglos descrito es el utilizado para el diagnóstico del síndrome de TORCH, el cual permite el tamizaje contra *Toxoplasma*, HCMV, HSV-1 y 2 y Rubeola. También se han hecho algunas pruebas con oligosacáridos unidos a una membrana de nitrocelulosa que reconocen proteínas específicas, con lo que se abre la posibilidad para el desarrollo de microarreglos de oligosacáridos para el diagnóstico de enfermedades virales.

## Limitantes de la técnica

El control de calidad de los microarreglos, además de los costos, el diseño y la fabricación, es uno de los aspectos más difíciles de manejar, debido a las dificultades de estandarización, dado el gran número de sondas que se necesitan en cada biochip. Por otro lado, los estudios de microarreglos utilizados para predecir la expresión de proteínas son poco precisos debido a que la cantidad de mRNA detectado no necesariamente refleja la cantidad de proteínas sintetizadas, ni la actividad enzimática o de las señales de traducción extranuclear. Justamente, por lo anterior, se justifican los nuevos acercamientos basados en microarreglos de proteínas; sin embargo, esta aplicación es limitada debido a las dificultades en su ejecución y a la baja cantidad de muestras que se pueden procesar. Para superar algunas de estas dificultades se han desarrollado nuevos modelos matemáticos y nuevas tecnologías que han dado origen a una nueva rama del conocimiento llamada bio-informática.

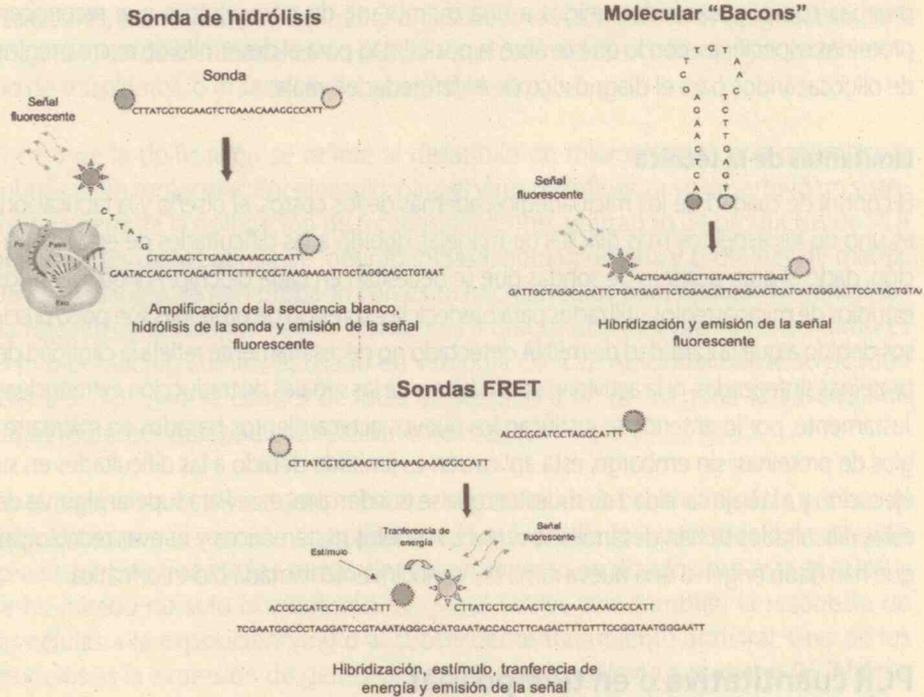
## PCR cuantitativa o en tiempo real

Higuchi, en 1992, desarrolló un sistema que permitía la detección del producto de PCR a medida que se producía y se acumulaba. El método se basa en la utilización de bromuro de etidio que se intercala entre las dos cadenas de ADN amplificado, y la detección correspondiente mediante un termociclador que permite el envío de la señal fluorescente a un computador. La señal se incrementa de manera exponencial de la misma manera que se van amplificando las cadenas de ADN.

La qPCR determina la cantidad de cADN (o el mRNA correspondiente) en una muestra específica. En virología esta técnica ha sido bastante usada para detectar el número de partículas virales en una muestra (carga viral). Al igual que los microarreglos, y por su menor variabilidad, la qPCR se utiliza para los estudios de expresión génica y validación de los resultados obtenidos con los microarreglos.



Además de agentes intercalantes como el bromuro de etidio utilizado por Higushi, también se han desarrollado sondas específicas marcadas. Entre los agentes intercalantes el más utilizado hoy es el SYBR green, que es fácil de optimizar, más económico y a diferencia del bromuro de etidio, no es cancerígeno; sin embargo, también tiene inconvenientes, pues no es específico ni permite identificar polimorfismos en la secuencia a amplificar. Las sondas marcadas consisten en pequeñas secuencias de oligonucleótidos mar-



casas con dos fluorocromos, uno donante que emite la señal y otro receptor que la neutraliza. Así, cuando son separadas las secuencias, el receptor deja de neutralizar la señal y el equipo podrá detectar la señal fluorescente.

La técnica de qPCR está desplazando la PCR convencional debido a que, además de tener las mismas ventajas, esta requiere menos tiempo, incluye solo una reacción, se disminuyen las fuentes contaminantes, es más precisa y permite cuantificar o identificar mutaciones del producto al tiempo que se amplifica; de ahí su nombre de PCR en tiempo real. Por las razones anteriores, la qPCR es cada día más usada en el laboratorio de diagnóstico. Ahora podemos encontrar estuches comerciales para la detección de VIH, VHB, VHC, CMV y están en desarrollo pruebas para detectar Herpesvirus, enterovirus, virus JC, virus BK, entre otros.

## Conclusión

Aunque todas estas nuevas tecnologías se constituyen cada día en una herramienta fundamental para el diagnóstico viral, aún no reemplazan las técnicas clásicas de aislamiento e identificación viral. Recordemos que estas técnicas nos permiten determinar si el virus detectado corresponde a una partícula viral infecciosa, inactivada o defectuosa. Sin embargo, la combinación de estos métodos con el diagnóstico clínico permite que cada día se haga un diagnóstico más rápido y preciso de las enfermedades causadas por virus, lo que permitirá instaurar tratamientos específicos y oportunos.

## Bibliografía

Jonathan P. Clewley. A role for arrays in clinical virology: fact or fiction? *Journal of Clinical Virology*. 2004. 29: 2–12.

Lissa Harris. *The Scientist*. 2005. August. Vol: 19 (16): 27-31

Joydeep D. Chaudhuri. Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. *Med Sci Monit*. 2005; 11(2): RA52-62.

Sepideh Zareparsy, Alfred Hero, Donald J. Zack, Robert W. Williams, and Anand Swaroop. Seeing the Unseen: Microarray-Based Gene Expression Profiling in Vision.

*Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004. August. Vol. 45, No. 8

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992. 10:413–417.

Josep Costa. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22(5): 299-305.