

7. Análisis de biomarcadores empleando *biochips* y matrices de biomoléculas

ÁNGEL HERRÁEZ*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá.

RESUMEN

Las micromatrices de ácidos nucleicos y de proteínas son una herramienta idónea para el análisis de biomarcadores de forma sistematizada y con capacidad para procesar un elevado número de muestras. En este capítulo se describen los elementos constituyentes de esta tecnología:

* **Información de contacto:**

Doctor Ángel Herráez Sánchez.

Profesor Titular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá.

28871 Alcalá de Henares (Madrid), España.

Tel.: +34 91 885 45 11. Fax: +34 91 885 45 85.

email: angel.herraez@uah.es

Abreviaturas: **AFM** (de *atomic force microscopy*) microscopía de fuerza atómica; **CCD** (de *charge-coupled device*) dispositivo de cargas interconectadas, un tipo de sensor electrónico empleado en cámaras digitales de foto y vídeo; **ELISA** (de *enzyme-linked immunosorbent assay*) inmunoensayo basado en la adsorción sobre una superficie y la detección enzimática; **NTA** (de *nitrotriacetic acid*) ácido nitrotriacético, o nitrotriacetato; un quelante de metales pesados, como el níquel; **PCR** (de *polymerase chain reaction*) reacción en cadena de la polimerasa; método de amplificación de DNA *in vitro*; **PVDF** (de *polyvinylidene fluoride*) poli(fluoruro de vinilideno), material utilizado en la preparación de membranas para la adsorción de proteínas y ácidos nucleicos; **RCA** (de *rolling circle amplification*) amplificación de DNA con círculo rodante; **SELDI** (de *surface-assisted laser desorption/ionization*) desorción e ionización con láser asistida por la superficie, una variante de espectrometría de masas adecuada para analizar proteínas; **SNP** (de *single nucleotide polymorphism*) polimorfismo de un solo nucleótido; **SPR** (de *surface plasmon resonance*) resonancia de plasmones de superficie.

formatos, tipos de soporte, técnicas empleadas para su preparación y métodos para la detección de la señal que permita la identificación y cuantificación de las biomoléculas marcadoras de interés. Se ilustran asimismo mediante ejemplos algunas de las estrategias de diseño y de aplicación de las micromatrices o chips.

Palabras clave: Matrices. Micromatrices. Chips de DNA.

ABSTRACT

Biomarker analysis using biochips and biomolecule arrays

Nucleic acid and protein microarrays are a suitable tool for the analysis of biomarkers systematically and with the ability to process a high number of samples. This chapter describes the elements composing this technology: formats, types of support, techniques used for their preparation, and methods for the detection of signal that allows to identify and quantify the marker biomolecules of interest. Examples are used to further illustrate some of the design strategies and applications of microarrays or chips.

Keywords: Arrays. Microarrays. DNA chips.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo habitual de las técnicas de análisis, en todos los campos, experimenta una evolución constante hacia la reducción en la cantidad de muestra necesaria, la mayor rapidez del ensayo y la automatización. Por otra parte, cada vez es más frecuente la necesidad de analizar de forma sistemática un número elevado de muestras, a ser posible al mismo tiempo, así como de evaluar simultáneamente varios parámetros, dando lugar a lo que se conocen como **técnicas múltiplex** (bien desde el punto de vista del número de muestras procesadas en un mismo ensayo, bien del número de parámetros analíticos ensayados sobre cada muestra). En todas estas tendencias las micromatrices ofrecen una utilidad clara, en particular para los ensayos que implican biomoléculas, principalmente ácidos nucleicos y proteínas, pero también péptidos, oligonucleótidos, lípidos y oligosacáridos. Concretamente, las dos principales aplicaciones

donde el formato de micromatrices ofrece su mayor potencial son quizá la separación de algunas de estas moléculas de entre una mezcla compleja de moléculas similares y el análisis de qué moléculas son capaces de establecer una interacción específica entre sí.

Estas aproximaciones metodológicas, por su fácil adaptación a un número elevado de muestras, su automatización y la consiguiente normalización de resultados, son idóneas para el análisis de biomarcadores de naturaleza diversa.

2. ORGANIZACIÓN DEL CAPÍTULO

La utilización de las micromatrices para la detección de biomarcadores, y biomoléculas en general, se ha plasmado en una gran diversidad de diseños experimentales, de modo que resulta difícil unificar dichos ensayos en una sola descripción. La alternativa es describir algunas aplicaciones concretas, pero éstas no dejan de ser ejemplos de decisiones puntuales en el diseño del ensayo. Por otra parte, no es el objetivo de este capítulo el identificar biomarcadores significativos o describir aplicaciones concretas de alguno de ellos —aspectos que serán mejor abordados en otros capítulos de esta monografía, con temática específica—, sino más bien aportar información sobre la aplicabilidad del formato de matrices para la determinación de los biomarcadores en general.

Pensando en ofrecer una panorámica generalizada e integral, se ha optado por un enfoque sistemático de todos los elementos componentes del ensayo, que podrán luego combinarse de diversas formas para elaborar una aplicación específica, dependiendo de factores como la naturaleza química de las muestras y las sondas (ácidos nucleicos, proteínas...), su disponibilidad (cantidad, concentración, pureza), el número de ellas que deben implicarse simultáneamente en el análisis, o la tecnología disponible para la preparación y procesado de las matrices y para la detección.

Abordaremos, pues, los tipos de soporte, las técnicas de aplicación y fijación de las muestras para constituir la matriz y las empleadas para la detección final de las biomoléculas capturadas. Finalmente se ilustrará el conjunto con algunos ejemplos más específicos de aplicación a proteínas y a ácidos nucleicos.

3. TERMINOLOGÍA

En este campo, es frecuente encontrarse con el uso de los términos en inglés (como *array*). Sin embargo, si investigamos un poco la palabra inglesa, veremos que habitualmente no se trata de un término de nuevo cuño, sino de la asignación de un nuevo significado, especializado, para una palabra existente. No hay razón, pues, para no hacer lo mismo en español, y se gana mucho en comprensión del significado de los términos.

3.1. Array

El término *array*, en inglés, significa «una disposición ordenada» de objetos y, más concretamente en matemáticas, una disposición geométrica de elementos, frecuentemente en un patrón bidimensional, en una retícula ortogonal. El término matemático habitual en español es **matriz** (de números, de datos, de puntos...), que parece, pues, fiel al significado original y adecuado para traducir *array* también en el ámbito que nos ocupa. Este término, si bien no demasiado frecuente (debido a la mala costumbre de importar términos en inglés sin intentarlos interpretar y traducir), se puede ya encontrar en numerosos textos. En diversos países de Hispanoamérica es más frecuente el uso de **arreglo**, siguiendo la inspiración no matemática de *array*.

Hablaremos, pues, en este capítulo de matrices de DNA, matrices de proteínas, micromatrices, etc.

3.2. Chip

Esta es otra palabra singular, con varios significados comunes pero uno especializado, en el área de la electrónica, del cual procede el uso que nos interesa: un soporte basado en silicio y en la tecnología de procesamiento y grabado de circuitos integrados. En el caso de las biomoléculas (*chips* de DNA), se mantienen material y formato del soporte, y parte de la tecnología, aplicándolos a la unión de las respectivas biomoléculas sobre dicho soporte.

En este caso, la especialización del término en inglés (que se aleja marcadamente del significado en lenguaje habitual: astilla, esquirla,

escama o trocito) y su amplia difusión como tal en español desde hace tiempo parecen recomendar mantenerlo tal cual más que buscar una traducción. Se usan con cierta frecuencia algunos derivados como *biochip*, *genochip* o *genechip* (que es marca registrada), sin especial diferencia en su significado. En general, usaremos el término como sinónimo de micromatriz, aunque con mayor especificidad se suele aplicar a las matrices cuyo soporte es de silicio, a veces también de vidrio.

3.3. Spot

Literalmente, podríamos hablar de «mancha», «mota» o «punto» en el sentido de ubicación. El significado aplicable es la zona donde ha quedado aplicada la muestra sobre el soporte; el conjunto de ellas constituye la matriz. A falta de una palabra con el significado preciso, usaremos aquí **punto** (en terminología de electroforesis unidimensional, se usa «banda», pero esto no parece adecuado aquí; en electroforesis bidimensional igualmente hay *spots* y no *bands*).

Para el proceso de aplicación de las muestras (*spotting*), usaremos **impresión**, por la similitud técnica en muchas de las modalidades de aplicación (véase más adelante la sección dedicada a las tecnologías de preparación de la matriz).

4. APARICIÓN DEL FORMATO EN MICROMATRIZ

El desarrollo de las micromatrices se puede considerar una consecuencia de la progresiva miniaturización, habitual en todo tipo de técnicas de análisis y de síntesis: al igual que de los tubos de ensayo se ha ido pasando a las **microplacas** (de 96 pocillos y luego cifras cada vez mayores: 384, 1.536...), de éstas se pasa a las **micromatrices** (hasta 10^5 muestras actualmente). Entretanto han surgido también aplicaciones con **macromatrices**, que usan un número reducido de muestras (unas decenas o centenas) pero técnicamente son más similares a las micromatrices que a las placas.

Por otra parte, en cuanto al tipo de ensayo implicado, las matrices son la evolución de los ensayos «dot blot», en los que se aplican gotas

de muestras sobre un soporte sólido absorbente y luego se revela la presencia de la molécula de interés con reactivos aplicados a todo el conjunto. Existen, no obstante, algunas diferencias asociadas a la transición a micromatrices, que se resumen a continuación.

La diferencia principal reside en la utilización de soportes absorbentes en los ensayos «dot blot», comúnmente nitrocelulosa, nailon o PVDF, que proporcionan alta capacidad de muestra, pero poseen limitaciones en cuanto a la escasa definición de forma y límite de los puntos, la dificultad de controlar con precisión la cantidad de biomolécula y la variabilidad estructural del soporte, que se hincha y se encoge dependiendo de su hidratación. En contraste, las micromatrices acuden principalmente al uso de soportes no absorbentes y rígidos, con mejor estabilidad mecánica, con una ubicación, forma y límites precisos para cada muestra aplicada, con una densidad homogénea de biomolécula en todo el punto, y con mejor accesibilidad molecular, al estar toda la biomolécula ubicada en la superficie, lo que suprime limitaciones cinéticas y estéricas, además de facilitar las etapas de lavado.

Por otra parte, existe una variación en cuanto al diseño de los ensayos: en los «dot blots» la diana (múltiples muestras desconocidas que se pretende analizar) queda unida al soporte, y se hace interaccionar con la sonda (molécula conocida con la que se hace la detección) que está en disolución. Por el contrario, en las matrices lo más común es inmovilizar las múltiples sondas y ensayarlas con la muestra diana, única, en disolución. En ambos casos, el resultado es similar pues la variable clave es la interacción entre dos moléculas, sonda y diana; únicamente varían los detalles del procedimiento.

5. CLASIFICACIÓN DE LAS MATRICES O *CHIPS*

5.1. Densidad de muestras

Se distingue a veces entre **macromatrices** y **micromatrices** para hacer referencia al número de muestras o sondas fijadas en la matriz e, indirectamente, al tamaño de sus puntos. Sin embargo, no existe una correlación directa con el tamaño del soporte físico de la matriz (que deriva del producto de tamaño de cada punto y número de puntos).

De forma aproximada, las macromatrices contienen unas decenas o centenas de puntos y las micromatrices hasta 10^5 puntos actualmente, en superficies de entre 5 y $1,6 \text{ cm}^2$.

5.2. Tipo de biomolécula inmovilizada

Quizá el primer ejemplo de *biochip*, y en buena medida aún el más frecuente, es aquel que incorpora moléculas de ácido nucleico. Tanto en lo relativo a la metodología como a las aplicaciones, debe distinguirse entre matrices de oligonucleótidos (habitualmente sintéticos) y matrices preparadas con fragmentos de ácidos nucleicos (obtenidos a partir de muestras biológicas). Otras modalidades surgidas posteriormente, y cada vez con mayor aplicación, son las matrices de péptidos, de proteínas y de oligosacáridos (libres o formando parte de glicolípidos), entre otros.

5.3. Método de preparación

Con respecto a este criterio, lo más destacable es la distinción entre las matrices obtenidas por síntesis química directa sobre el soporte y las conseguidas mediante aplicación de las sondas en forma de microgotas. El primer método se emplea principal y quizás exclusivamente con oligonucleótidos, aunque es factible aplicarlo a péptidos. Con respecto al segundo, se han desarrollado tanto métodos de aplicación por contacto como otros sin contacto físico con el soporte, que emplean bien tecnología de inyección similar a la usada en impresoras o bien electroaerosol (métodos explicados más adelante).

5.4. Propósito del ensayo

5.4.1. *Micromatrices analíticas*

En este caso, el objetivo es el estudio de las biomoléculas presentes en una muestra compleja, mediante su identificación. La matriz incluye una colección de posibles dianas diseñadas teniendo en cuenta su potencial para interaccionar con las moléculas que interesa detectar en la muestra.

Por ejemplo, una colección de oligonucleótidos fijados en la matriz permite detectar, mediante hibridación, un genotipo concreto en la muestra. O una colección de anticuerpos anclados al soporte permite caracterizar la presencia de determinadas proteínas en una muestra.

5.4.2. *Micromatrices funcionales*

En este tipo de ensayo el objeto de estudio son las biomoléculas inmovilizadas en la matriz, que se ensayan contra una sonda única.

Por ejemplo, se inmoviliza un número grande de proteínas, incluso un proteoma completo, y se analiza con cuáles de ellas interacciona una biomolécula sonda (que puede ser otra proteína, un ácido nucleico o una molécula pequeña). Estas matrices sirven para multitud de propósitos, como el ensayo de sustratos enzimáticos, otros ensayos bioquímicos diversos o la identificación de fármacos y sus dianas.

6. SOPORTES Y FORMATOS

Se ha observado que la naturaleza del soporte y, particularmente, la de su enlace con las biomoléculas son aspectos esenciales para determinar el rendimiento y la eficacia del sistema. Generalmente, cada aplicación y biomolécula concretas requieren una puesta a punto semiempírica hasta elegir el soporte que ofrezca los mejores resultados para el ensayo.

6.1. Vidrio

Se trata de un soporte económico, con propiedades físicas convenientes y fácil de modificar químicamente para la unión covalente de las biomoléculas o bien para su síntesis *in situ*. Puede tratarse simplemente de un portaobjetos de uso común en microscopía.

En algunos casos, tanto el vidrio como otros soportes se recubren con otro material, como polilisina, dextrano, oro... cuyas propiedades son ventajosas para el diseño específico del ensayo. Los detalles y la aplicabilidad de tales recubrimientos se describen en apartados posteriores.

6.2. Polipropileno

Se utiliza con menos frecuencia, pero puede ser interesante por su flexibilidad. En ciertas modalidades es conveniente porque permite sellar sobre él por presión las celdillas componentes de un sistema de nanopocillos.

6.3. Silicio

Es en este caso cuando el término *chip* adquiere su significado más literal (procedente de la tecnología del área electrónica). Presenta el inconveniente de ser más caro y, por ello, su aplicación suele estar limitada a trabajos a pequeña escala en investigación.

6.4. Membranas

Se utiliza este nombre para referirse a diversos materiales porosos fabricados en forma de lámina, de uso habitual en inmunoensayos y en hibridación de ácidos nucleicos. Los más comunes son nitrocelulosa, nailon y PVDF —poli(fluoruro de vinilideno)—. Su uso en matrices no es muy abundante; entre sus principales limitaciones podemos citar que a menudo no permiten densidades de proteína altas, el material aplicado puede extenderse de modo no controlable y, en general, la relación señal/ruido es deficiente debido a su carácter absorbente.

6.5. Nanopocillos

Cuando la cantidad de biomolécula que se puede aplicar sobre un soporte plano es insuficiente para conseguir un ensayo eficaz, se acude a sistemas donde la superficie de interacción se aumenta, bien formando un pequeño pocillo o bien utilizando un soporte poroso de suficiente grosor (un gel, descrito en el siguiente apartado).

Tales pocillos o nanopocillos se consiguen con materiales moldeables y se pueden considerar versiones en miniatura de las microplacas. Pueden tener base circular o cuadrada, habitualmente con dimensiones

entre 0,1 y 2,5 mm de ancho y de 0,1 a 1 mm de profundidad. Un material usado frecuentemente es el polidimetilsiloxano, un elastómero de silicona. Se polimeriza sobre un molde acrílico, para que adopte la forma deseada, luego se despegar y se coloca sobre vidrio o polipropileno (Figura 1). También se han conseguido moldes fabricando su estructura mediante técnicas microlitográficas.

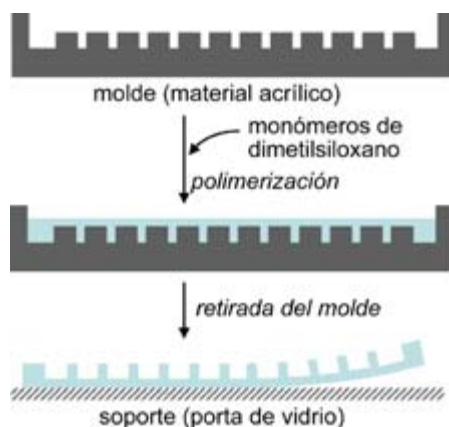


FIGURA 1. **Preparación de nanopocillos.** El polidimetilsiloxano, un elastómero de silicona, es uno de los materiales utilizados más comúnmente para este formato. Una vez polimerizado, se extrae del molde y se coloca sobre el soporte de la matriz.

Entre las ventajas de los nanopocillos se puede citar una menor tasa de evaporación de las muestras (comparado con un soporte plano como el vidrio), la dificultad de contaminación cruzada entre puntos de muestra y la posibilidad de efectuar reacciones que requieren la mezcla de múltiples componentes. Existe la posibilidad de usarlos con el equipo robótico estándar, pero para ello a menudo se requiere un alineamiento para que la aplicación de muestras se ajuste exactamente a la geometría de los pocillos, lo que, en la práctica, supone una limitación.

6.6. Geles

La otra forma de conseguir una alta capacidad de muestra en un espacio reducido es preparar una matriz compuesta por pequeños bloques de gel fijados sobre vidrio o un soporte similar (Figura 2). El gel

proporciona una malla polimérica tridimensional porosa, en la que se introducen por difusión las biomoléculas componentes de la matriz y los reactivos posteriores que conforman el ensayo.

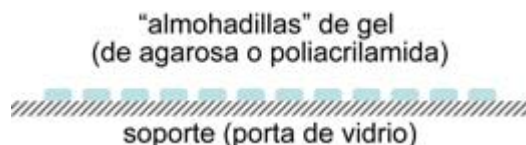


FIGURA 2. «Almohadillas» de gel: pequeñas porciones de gel formadas sobre el soporte y que permanecen fijadas a él. Cada una recibirá una muestra.

Tales bloques, llamados «almohadillas» (*gel pads* o *nanopads*), son pequeñas porciones de gel (cubos de unos 25 μm de lado) ubicadas en forma de matriz bidimensional y separadas entre sí por «fronteras», zonas donde el soporte no queda cubierto por el gel y que suelen hacerse hidrófobas para evitar la contaminación entre posiciones adyacentes de la matriz. Por ejemplo, se pueden generar dichas matrices de almohadillas de gel empleando máscaras fotolitográficas (véase un apartado posterior) para controlar la fotopolimerización de la acrilamida con radiación ultravioleta de 254 ó 312 nm. También se puede formar una capa delgada de agarosa siguiendo un patrón trazado por fotolitografía sobre el soporte de vidrio.

6.7. Partículas en suspensión

Algunos diseños escapan del concepto literal de matriz, aunque mantienen los principios moleculares de diseño y el mecanismo, utilizando suspensiones de partículas sobre las que se fijan las biomoléculas sonda.

Por una parte, es posible el uso de microesferas magnéticas, con una sencilla separación de las fracciones unida y libre tras el ensayo (análoga a las etapas de lavado de una micromatriz). También se ha descrito el uso de microesferas coloreadas, nanocristales semiconductores (*quantum dots*), microesferas con código de barras o microvarillas fabricadas con varios metales. Los detalles de todas estas técnicas exceden las posibilidades de este capítulo, pero la mayor parte de los principios y herramientas básicas son comunes a lo que se presenta aquí.

6.8. Laboratorio en un chip

Para aplicaciones muy selectivas se han llegado a diseñar dispositivos conocidos con este nombre (*lab-on-a-chip*), que utilizan técnicas de tallado de diminutos canales y cámaras de reacción por los cuales se hacen circular los reactivos sobre las biomoléculas inmovilizadas. Sobre el mismo soporte se realizan todas las etapas de reacción y las de detección.

De algún modo, estos diseños se pueden considerar como el caso extremo de sofisticación, miniaturización y, en particular, integración de todos los componentes y etapas del ensayo, que resulta en todo similar al realizado con una matriz, pero reducido a una mínima intervención por parte del analista. En realidad, la aplicación de estos sistemas va más orientada hacia el análisis de un número reducido de moléculas, comparada con la mayor versatilidad y diversidad de los sistemas de micromatrices.

7. TECNOLOGÍAS DE PREPARACIÓN DE LA MATRIZ

7.1. Aplicación manual

En aplicaciones a pequeña escala y utilizando matrices de baja densidad de muestras, con un número reducido de biomoléculas sonda, puede simplemente utilizarse la aplicación manual, sobre posiciones discretas del soporte, de pequeños volúmenes de disolución (gotas) mediante micropipeta. Esta metodología entronca directamente con las técnicas precedentes, como el «dot blot» sobre membranas y las placas de pocillos.

Evidentemente, según aumenta el número de muestras a procesar, o de sondas a utilizar en cada ensayo, así como la necesidad de obtener resultados reproducibles, esta aproximación se hace impracticable y es preciso sustituirla por variantes automatizadas que, sin embargo, retienen los mismos principios fundamentales.

7.2. Aplicación automatizada

Se han ido desarrollando diversos sistemas de gestión y aplicación de las muestras de forma automatizada, mediante tecnología robótica. Con ello, se ha hecho posible aumentar el número de sondas y dianas ensayadas, así como reducir el tiempo del proceso. También aumenta radicalmente la reproducibilidad de los ensayos y de los resultados. Todo esto forma parte de lo que se conoce como técnicas *high-throughput*, es decir, de elevado rendimiento, aunque no se trata tanto de una alta eficacia—entendida como resultados positivos— como del volumen de ensayos procesados; algunos términos alternativos para transmitir esta idea pueden ser técnicas ultrarrápidas o técnicas masivas.

La robotización de los ensayos implica la imposición de formatos comunes; por ejemplo, la placa de 96 pocillos como contenedor del que se toman las muestras y determinada geometría y dimensiones en las matrices producidas.

Los sistemas robotizados emplean diferentes técnicas para la aplicación de las muestras sobre el soporte; a continuación se describen las que han alcanzado mayor implantación.

7.3. Tecnología de inyección de tinta

Aprovechando la amplia experiencia de diseño e ingeniería de las impresoras de inyección de tinta, se han desarrollado sistemas de aplicación de muestras sobre el soporte (1) para construir la matriz de biomoléculas (Figura 3). La reutilización de esta tecnología ha aportado un desarrollo técnico sencillo y rápido. La formación de las gotas (entre 25 y 100 μm de diámetro, con un volumen de 10 a 500 pL) se consigue bien por calentamiento puntual (impresión térmica), que genera una diminuta burbuja que proporciona el impulso a la gota, o por presión local (impresión piezoeléctrica). Aunque la resolución ha mejorado, existen límites físicos asociados a la técnica, que limitan la densidad de puntos que es posible conseguir; estos pueden tener un tamaño de entre 50 y 150 μm .

Por ejemplo, en el caso de síntesis de oligonucleótidos *in situ* basta con sustituir el disolvente habitual, acetonitrilo, por otro menos volátil

y más viscoso, como el adiponitrilo (con seis carbonos en lugar de dos). Los reactivos más caros, los nucleótidos protegidos y activados, se emplean en la cantidad justa (la tecnología de cuatro tintas se adapta con facilidad para suministrar cuatro disoluciones de nucleótidos). Las etapas de oxidación, desprotección y lavados, comunes a todas las posiciones de la matriz, pueden hacerse recubriendo ésta con las respectivas disoluciones, más económicas.

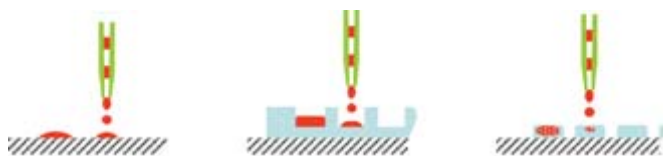


FIGURA 3. *Aplicación de muestras mediante tecnología de inyección de tinta. Se ilustra su empleo sobre soportes diversos.*

7.4. Electroaerosol

En esta técnica, entre la boquilla dispensadora de la biomolécula en disolución y la superficie del soporte (que debe ser metálico o tener una base metálica) se establece una diferencia de potencial elevada (por ejemplo, de 1 kV). Ésta hace que el líquido que sale de la boquilla se pulverice en forma de aerosol antes de depositarse en el soporte (Figura 4). Este método permite obtener puntos de alrededor de 30 μm .

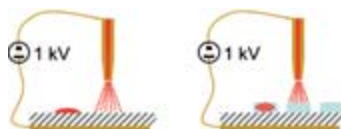


FIGURA 4. *Aplicación de muestras mediante tecnología de electroaerosol sobre soportes diversos.*

7.5. Impresión por contacto

En este caso se emplean agujas diminutas, bien macizas (simplemente impregnadas en la disolución de la biomolécula) o bien en forma de «pluma» con una ranura capilar (que confiere una mayor capacidad

de líquido). La muestra se transfiere por capilaridad al soporte al contactar suavemente la aguja con éste (Figura 5). El sistema está, obviamente, robotizado y permite dispensar volúmenes incluso inferiores a un nanolitro, y alcanzar densidades de más de 30.000 muestras por matriz.

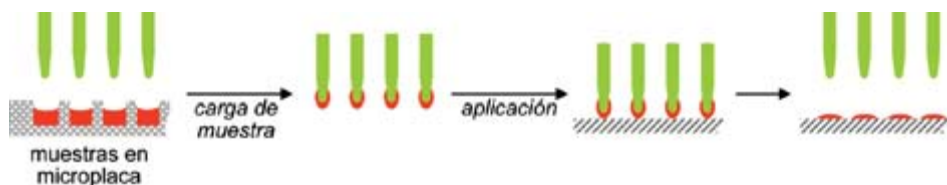


FIGURA 5. *Aplicación de muestras mediante impresión por contacto.* Las muestras se toman habitualmente de una microplaca de múltiples pocillos, en la que se mojan las agujas, y se depositan por contacto leve con el soporte elegido.

7.6. Fotolitografía

Esta técnica es probablemente la más frecuente para la síntesis *in situ*, es decir, aquella modalidad en la que las biomoléculas componentes de la matriz se sintetizan directamente sobre el soporte, y quedan ancladas a él de modo covalente desde el comienzo de su síntesis hasta su empleo en el ensayo. Puede aplicarse a matrices de péptidos, pero lo más habitual son las matrices de oligonucleótidos.

Se utilizan los procedimientos químicos de síntesis en fase sólida con una sola adaptación, que afecta al grupo protector del extremo de la cadena que ha de reaccionar con el siguiente aminoácido o nucleótido. La retirada de este grupo se hace mediante una reacción fotoquímica: el protector se elimina gracias a la incidencia de luz, generalmente ultravioleta. Por tanto, los puntos de la matriz que sean iluminados quedarán dispuestos para la incorporación del siguiente residuo que se añada, mientras que el resto no experimentan esa elongación (Figura 6).

La tecnología preexistente en las industrias de impresión y grabado y, particularmente, en la fabricación de circuitos integrados, fue rápidamente adaptada para aplicarla en la síntesis de matrices. La clave está en la utilización de una serie de «máscaras» que bloquean la incidencia de luz en ciertos puntos de la matriz y la permiten en otros. De este modo, mediante la sucesión programada de diferentes máscaras se con-

sigue la síntesis en paralelo de cualquier combinación de moléculas, con secuencia diferente en cada una de las posiciones de la matriz (2, 3). En un *chip* típico de $1,28 \times 1,28$ cm pueden prepararse 250.000 celdillas o más, con dimensiones de 25, 10 y hasta $3 \mu\text{m}$, y cada una conteniendo millones de moléculas idénticas con la secuencia específica diseñada para esa celdilla.

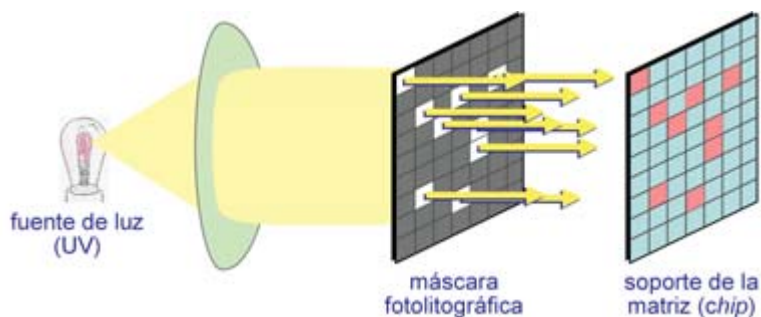


FIGURA 6. *Fotolitografía aplicada a la síntesis directa sobre el soporte.* En las posiciones transparentes de la máscara se permite el paso de luz, que activa químicamente las correspondientes posiciones en el chip. Cambiando sucesivamente de máscara se consigue la síntesis combinatoria de los oligonucleótidos o los péptidos sobre el chip.

8. INMOVILIZACIÓN

En esta sección se describirán las principales técnicas empleadas para la fijación de las moléculas sonda al soporte. La inmovilización es una característica esencial en las matrices, pues permite el lavado de los excesos de reactivos y de todos los componentes de la muestra que no interaccionen con las moléculas sonda (o viceversa, dependiendo del diseño de la matriz y del ensayo).

8.1. Inmovilización pasiva

Se trata del método más simple, aunque no el de mejores resultados por ser poco selectivo. Consiste en la unión de las moléculas al soporte por mecanismos físicos y poco específicos, principalmente adsorción y absorción (Figura 7).

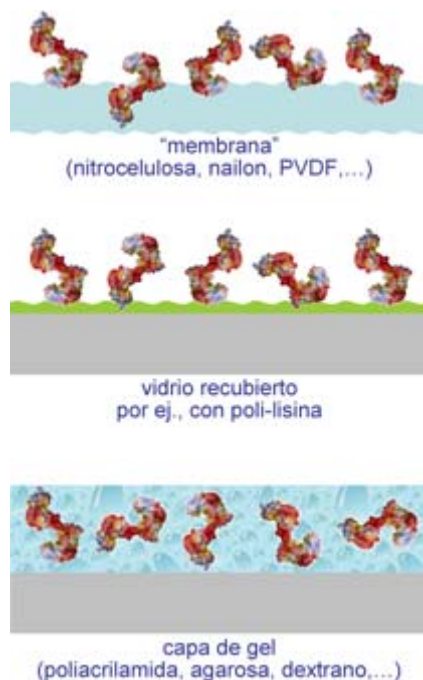


FIGURA 7. **Inmovilización por métodos pasivos.** La interacción entre las biomoléculas y el soporte es de naturaleza física. Los ejemplos se ilustran con proteínas, pero son igualmente aplicables a ácidos nucleicos.

El soporte más frecuente que permite estos mecanismos son las «membranas» de nitrocelulosa, nailon o PVDF (véase más arriba la sección dedicada a los soportes), así como soportes rígidos, como vidrio o plásticos, que han sido recubiertos con polilisina (cuya elevada carga positiva es particularmente útil para adsorber ácidos nucleicos).

También se puede incorporar la muestra o la sonda por difusión cuando el soporte se recubre con un medio poroso, caso de los gels de poliacrilamida, de agarosa o de dextrano (descritos anteriormente en la sección dedicada a los soportes).

La naturaleza tridimensional de la malla definida por estos polímeros supone como ventaja la posibilidad de fijar una mayor cantidad de molécula sonda, pero a costa de un intercambio más lento, pues se requiere la difusión de los reactivos implicados en el ensayo hasta el interior de la red tridimensional de poros, o su salida desde ella.

Las principales limitaciones de los métodos pasivos radican en el reducido control de la cantidad precisa y la orientación de la biomolécula sonda sobre el soporte, conduciendo a eficacia y reproducibilidad variables.

8.2. Inmovilización covalente

Con el fin de conseguir una unión más fuerte de las biomoléculas al soporte es frecuente acudir a la formación de enlaces covalentes. Ello aporta mayor estabilidad a la matriz, permite mayor densidad de moléculas sobre el soporte y admite proteínas más diversas. Adicionalmente, la respuesta de la matriz suele ser más reproducible.

La fijación química se inicia habitualmente mediante recubrimiento del soporte con un compuesto que facilite su reactividad; los más comunes son silanos, aldehídos y epóxidos. Por ejemplo, el soporte de vidrio puede unirse, a través de los grupos hidroxilo de la sílice, a un reactivo silano bifuncional, que por su otro extremo (grupo aldehído o epóxido) reacciona con grupos amino de la biomolécula a fijar, o con otros más específicos (Figura 8).

También se ha empleado la fijación covalente, a través de los grupos amino, sobre polidimetilsiloxano, una silicona que se puede moldear formando nanopocillos.



FIGURA 8. *Inmovilización por anclaje químico.* Aunque se ilustra con proteínas, es aplicable igualmente a ácidos nucleicos.

Otro ejemplo de aplicación es una capa delgada de agarosa solidificada sobre el soporte, que se activa químicamente con peryodato para formar grupos aldehído, los cuales forman enlaces covalentes con grupos amino de proteínas o de ácidos nucleicos.

Si el soporte incorpora poliacrilamida, ésta puede ser activada con glutaraldehído o con hidrazina (que convierte los grupos amida en grupos hidrazida) para ser reactiva con las biomoléculas.

Para conseguir un aumento señalado en la densidad de grupos reactivos sobre la superficie de la matriz se ha acudido a la utilización de dendrímeros, que son polímeros ramificados repetidamente (Figura 9).

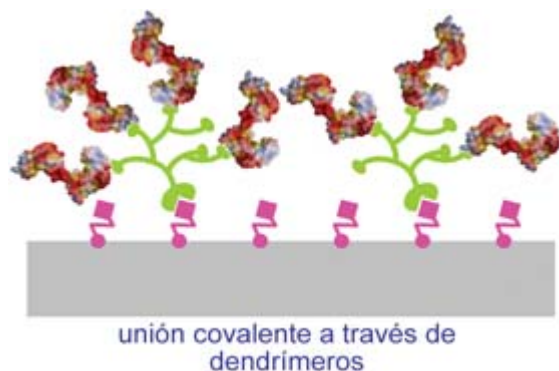


FIGURA 9. *Inmovilización química mediante dendrímeros.* Aunque se ilustra con proteínas, es aplicable igualmente a ácidos nucleicos.

Finalmente, algunos métodos utilizan vidrio recubierto de oro; este elemento, además de actuar de anclaje, por ejemplo para grupos tiol, posee la ventaja de permitir la detección con ciertas técnicas como la espectrometría de masas y la resonancia de plasmones de superficie (SPR, véase más adelante).

En todos estos métodos de fijación covalente la principal limitación es la orientación variable con la que pueden unirse las biomoléculas que formarán la matriz, que se traduce en una menor eficacia en la interacción posterior con la muestra a analizar y puede incluso disminuir la reproducibilidad. Por otra parte, al igual que en los métodos pasivos, la estructura de las proteínas fijadas es susceptible de alteración.

8.3. Inmovilización por afinidad

Esta aproximación, llamada también a veces captura biológica, presenta las mayores ventajas en cuanto a la especificidad de la fijación, la reproducibilidad y uniformidad de la orientación de las biomoléculas sobre el soporte y la integridad estructural de aquellas. Además, las matrices son estables y se consigue una elevada densidad de moléculas capturadas sobre la superficie.

Todas estas características son la consecuencia del mecanismo de fijación, a través de una interacción de reconocimiento específico entre moléculas (Figura 10). Esta aporta además habitualmente una elevada fuerza de unión, un enlace muy estable (recuérdese que, aun no siendo uniones covalentes, las constantes de afinidad de los anticuerpos suelen ser del orden de 10^{12} y la del par avidina-biotina está en torno a 10^{15}).

Como contrapartida, la preparación de la matriz requiere la inmovilización previa del agente de captura por uno de los métodos descritos anteriormente, y además en ocasiones dicho agente de captura es a su vez una macromolécula (caso de los anticuerpos), con lo que la casuística se repite. Por otra parte, las matrices de afinidad necesitan en general de mayores precauciones en su manejo y conservación, para preservar la interacción biológica en la que basan su acción.

A continuación se describen someramente los principios de las estrategias usadas con más frecuencia en esta modalidad.

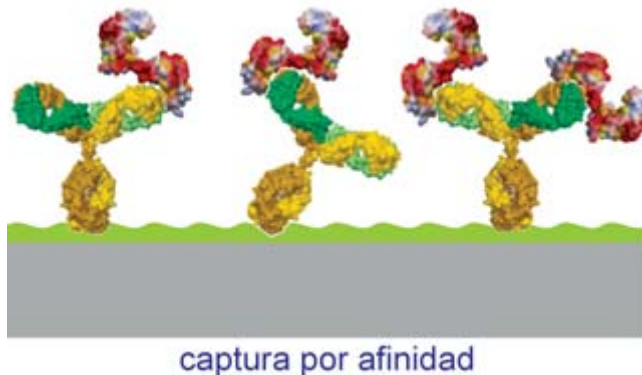


FIGURA 10. *Fijación de la molécula sobre el soporte gracias a una interacción de afinidad (en este caso, mediante anticuerpos).*

8.3.1. Antígeno con anticuerpo

Se trata de una de las interacciones entre biomoléculas mejor conocidas (Figura 11). Su aplicación más frecuente en las micromatrices es la preparación de matrices de proteínas. La selectividad en la captura de las moléculas objeto del estudio es muy elevada. La principal limitación reside en la obtención de anticuerpos cuya afinidad y especificidad sean adecuadas para cada una de las moléculas que se desea analizar, así como en las limitaciones asociadas a la fijación de los anticuerpos que son, asimismo, proteínas.

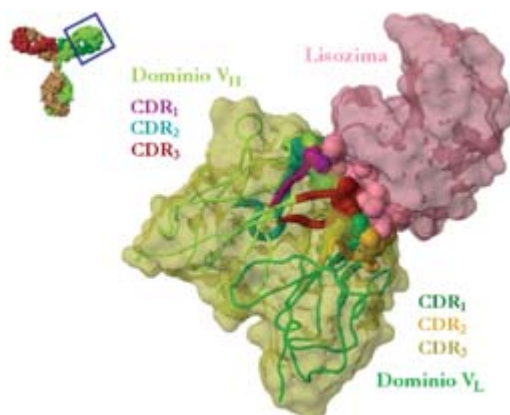


FIGURA 11. **Interacción entre antígeno y anticuerpo.** Reconocimiento de la lisozima (superior derecha) por parte de un anticuerpo específico (inferior izquierda). Se muestran sólo los dominios variables de las cadenas pesada (V_H) y liviana (V_L) de la inmunoglobulina G —que suponen alrededor de un sexto de la molécula completa—. En cordón grueso se resaltan las regiones CDR (determinantes de la complementariedad) y en esferas los átomos que establecen contacto directo con la otra molécula.

8.3.2. Biotina con avidina

La biotina, una pequeña molécula, es reconocida por las proteínas avidina (componente de la clara de huevo) y estreptavidina (producida por algunas especies de *Streptomyces*). Esta interacción (Figura 12) posee una de las afinidades más elevadas conocidas. Ambas proteínas se explotan comercialmente, así como variantes de ellas obtenidas por ingeniería genética. La biotina se puede unir fácilmente por métodos

químicos a los grupos amino, tiol u otros, tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. El sistema biotina-avidina constituye así una herramienta genérica común para la preparación de muchos tipos de matrices. También es habitual su uso, no sólo en la captura sobre el soporte, sino en la posterior etapa de detección (véanse los diseños de detección indirecta, en una sección posterior); por ejemplo, usando estreptavidina marcada con un fluoróforo para cuantificar la proteína o ácido nucleico que han sido previamente fijados por su interacción con la matriz.

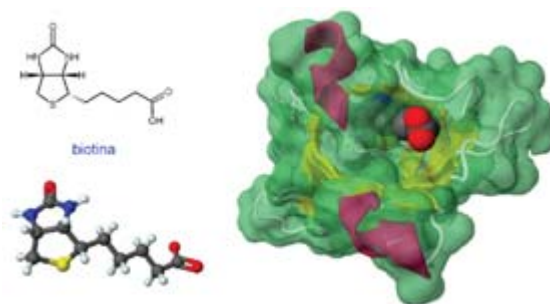


FIGURA 12. **Biotina y su interacción con estreptavidina.** A la izquierda, la estructura de la biotina. A la derecha se muestra una de las cuatro subunidades idénticas de la molécula de estreptavidina (modelo esquemático de cintas y superficie molecular semitransparente) y la molécula de biotina (modelo de esferas de van der Waals) dentro del bolsillo de unión. Los dos átomos en rojo al frente de la biotina son los oxígenos del grupo carboxilo, que es el punto por el cual la biotina se conjuga químicamente a las biomoléculas que se desea capturar.

8.3.3. Oligohistidina con Ni-NTA

Esta es una captura empleada con proteínas obtenidas por ingeniería genética. Durante su clonación, se les incorpora en un extremo de la cadena una secuencia de seis residuos correlativos de histidina, que actúa como «etiqueta» de afinidad. Esta agrupación de oligohistidina posee afinidad para ligar iones níquel, los cuales al mismo tiempo están coordinados parcialmente por el quelante nitrilotriacetato (NTA, Figura 13). El sistema se denomina abreviadamente 6xHis/Ni-NTA. El NTA suele estar fijado de modo covalente al soporte sólido de la matriz o, en general, a un polímero o resina en aplicaciones de tipo cromatográfico, permitiendo la captura de la proteína «etiquetada» de entre una muestra compleja de otras proteínas y biomoléculas.

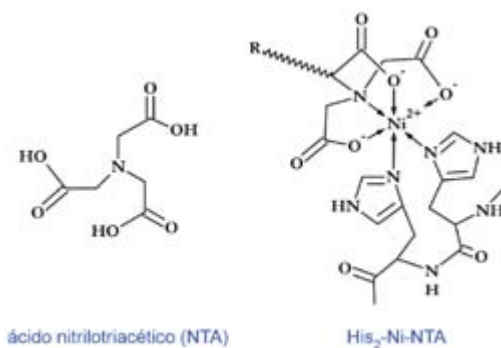


FIGURA 13. Estructuras del NTA y del complejo entre éste, el ion níquel y la oligohistidina.

8.3.4. Hibridación de ácidos nucleicos

Si bien alguno de los métodos de captura anteriores es aplicable para ácidos nucleicos, el método por excelencia es la hibridación molecular, es decir, la unión espontánea de dos moléculas monocatenarias de oligo- o polinucleótido siempre que sus secuencias sean complementarias, para formar una molécula bicatenaria o doble hélice. Las posibilidades de modular la selectividad de esta interacción controlando pH, temperatura y presencia de agentes competidores como la urea permiten adaptar la técnica a cada caso particular.

8.3.5. Otros

La afinidad biológica que actúa de forma continua y ubicua en los seres vivos proporciona muchas parejas de moléculas que pueden aprovecharse para conseguir un sistema de fijación específico. Basten un par de ejemplos adicionales, como el uso de la glutatión-*S*-transferasa con su sustrato, el glutatión, o el de la cutinasa —una serina-esterasa— con su inhibidor el fosfonato.

8.4. Síntesis *in situ*

Cuando las moléculas que se desea fijar al soporte son suficientemente pequeñas como para poderse preparar por síntesis química, puede

optarse por sintetizarlas directamente sobre el soporte, unidas de modo covalente a él. Dicha unión permite con facilidad retirar el exceso de reactivos y cualquier producto secundario de las reacciones, lo que, en efecto, garantiza la pureza del producto. Las técnicas de «síntesis en fase sólida» están bien establecidas tanto para oligonucleótidos como para péptidos, sus condiciones y rendimiento están optimizados y son susceptibles de automatización, con lo que la preparación de matrices es una aplicación inmediata.

Resumiendo, la síntesis *in situ* combina las ventajas de:

- a) los métodos de síntesis en fase sólida: elevado rendimiento de cada etapa de unión química y elevada pureza del producto sin necesidad de purificación;
- b) los métodos de química combinatoria: se consigue una gran diversidad de productos usando unas pocas etapas de reacción.

La aplicación de interés en micromatrices se concreta en la síntesis de una colección de numerosas moléculas (con secuencias distintas) para ensayar al mismo tiempo cuál de todas ellas es la diana reconocida por las moléculas de la muestra.

9. DETECCIÓN

9.1. Fluorescencia

En el campo de las micromatrices, la detección de la interacción efectiva entre sonda y muestra se efectúa mayoritariamente empleando la fluorescencia de una molécula, grupo «informador» o «etiqueta», que se ha unido previamente a una de las moléculas implicadas (la sonda o la muestra). Dicha etiqueta puede ser el propio fluoróforo, pero otra posibilidad es la incorporación inicial de una etiqueta no fluorescente seguida, en la etapa final, por la unión a ella del fluoróforo (Figura 14). A pesar del predominio de las técnicas de detección por fluorescencia, existen otras alternativas de aplicación menos generalizada pero crecientemente, algunas de las cuales describiremos en los apartados siguientes.

Las ventajas que hacen de la fluorescencia el método más común se centran en la posibilidad de detectar e incluso cuantificar la señal en

cada uno de los puntos de la matriz de forma casi simultánea, gracias a las tecnologías de láser, matrices de diodos, cámaras CCD, etc. Asimismo, es factible la detección concurrente de varios fluoróforos, permitiendo así el análisis de distintas variables en un mismo ensayo (lo que se conoce como ensayos múltiplex).

9.2. Amplificación de DNA por círculo rodante

En el empeño por reducir el umbral de detección, esta es una de las estrategias desarrolladas para amplificar la señal obtenida a partir de cada molécula unida a la matriz. Se puede combinar con una señal de cualquier tipo, aunque lo más común es utilizarla con fluorescencia o luminiscencia.

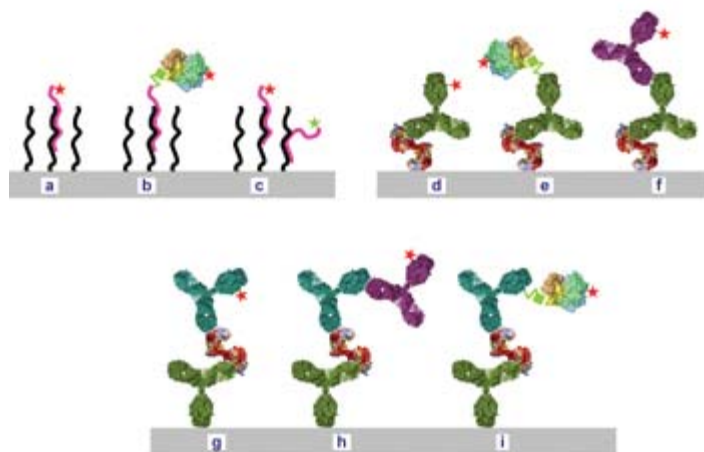


FIGURA 14. *Algunos diseños de ensayo para la detección mediante fluorescencia.* Son posibles innumerables combinaciones; se presentan aquí las más significativas. Para los propósitos de esta presentación se omiten los detalles de fijación de las moléculas sobre el soporte de la matriz; puede utilizarse para ello cualquiera de los mecanismos descritos anteriormente. Los ejemplos ilustran la detección de ácidos nucleicos (a-c) y de proteínas (d-i). La detección es directa (a, c, d, g) cuando el fluoróforo (representado por la estrella) está unido a la sonda, pero puede también hacerse de forma indirecta (b, e, h, i) cuando la sonda lleva unida una etiqueta a la que se une una segunda molécula que lleva el fluoróforo. En el caso de proteínas es frecuente el uso de dos anticuerpos en un diseño de tipo sándwich (g, h, i). Como consecuencia de todo ello, la detección de algunos ensayos se realiza en una etapa (a, c, d), mientras que otros requieren dos (b, e, f, g) o hasta tres (h, i). El diseño (c) ejemplifica la posibilidad de realizar la detección simultánea de varios parámetros utilizando fluoróforos con emisión en colores diferentes (se puede aplicar de modo análogo para proteínas).

La técnica RCA (*rolling circle DNA amplification*) se basa en la acción de una DNA-polimerasa que replica una pequeña molécula circular de DNA y posee la propiedad denominada desplazamiento de la hebra, es decir, que puede continuar recorriendo indefinidamente el molde circular porque a medida que avanza sobre éste va separando la hebra complementaria. El resultado es la síntesis de una cadena larga de DNA con varias copias consecutivas del círculo completo —lo que se denomina un concatémero—. Para aplicar este sistema a la detección de una matriz (Figura 15), la molécula que se va a detectar —por ejemplo, un anticuerpo que se ha unido a una proteína concreta en una posición de la matriz— lleva ligado, en lugar de un fluoróforo, un oligonucleótido. Este se ha diseñado con una secuencia que sirve de cebador en la reacción RCA.

Al mezclar el DNA molde circular, la polimerasa y los sustratos necesarios para ésta sobre la matriz, la DNA-polimerasa extiende el cebador generando el concatémero, que contiene numerosas copias del DNA molde. Realizando entonces la hibridación con una sonda fluorescente complementaria a algún punto de ese molde se genera una señal muy amplificada.

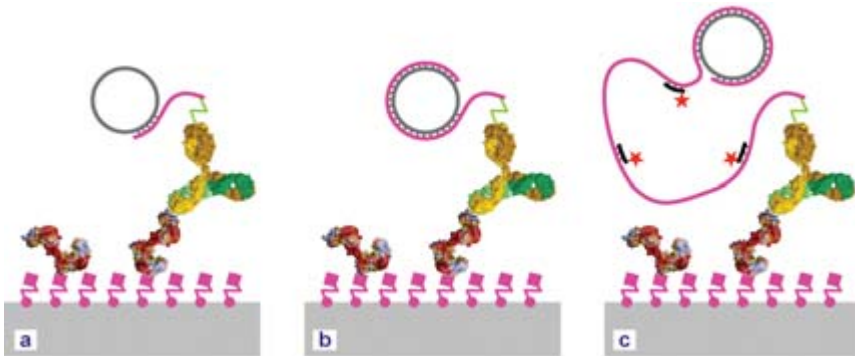


FIGURA 15. *Amplificación de la señal por círculo rodante.* (a) La molécula que se quiere detectar (aquí, un anticuerpo) se ha conjugado de forma covalente con un oligonucleótido. Este es complementario a un punto del DNA circular que hará de molde. (b) La polimerasa usa dicho oligonucleótido como cebador y comienza su elongación gracias al molde. (c) Al completar el círculo, la propia polimerasa desplaza la hebra recién sintetizada y continúa utilizando el molde para elongar la molécula, generando el concatémero. Una sonda puede hibridar con el concatémero en numerosos puntos, y se detecta la marca unida a dicha sonda.

9.3. Espectrometría de masas

En aplicaciones especializadas puede acudir a esta técnica para identificar la biomolécula capturada sobre la superficie. Para poderla aplicar, es preciso que la superficie del soporte sea metálica. Por ejemplo, en la modalidad SELDI (*surface-assisted laser desorption/ionization*, desorción e ionización con láser asistida por la superficie) las proteínas se capturan sobre la superficie metálica de una matriz de baja densidad, se vaporizan con el láser y se identifican en el espectrómetro de masas.

9.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

En este caso, no existe un reconocimiento molecular de la identidad de la molécula a analizar o del marcador unido a ella, sino que se detecta el volumen de la biomolécula (principalmente una proteína) que ha quedado retenida sobre la matriz. El microscopio de fuerza atómica recorre la superficie de la matriz y proporciona una imagen del relieve de dicha superficie, de modo que se aprecia en qué posiciones se han unido moléculas (Figura 16).

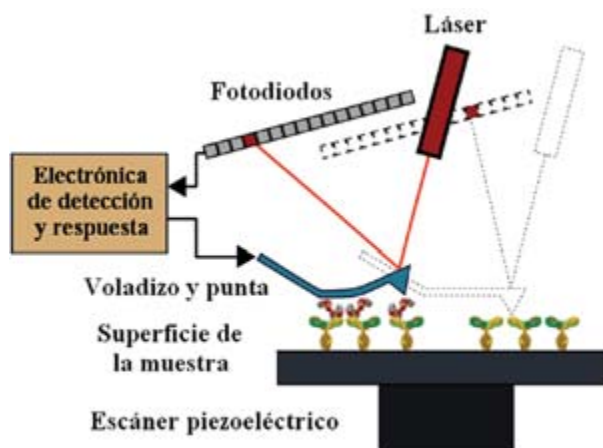


FIGURA 16. *Principio de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica aplicado a la detección de proteínas fijadas sobre el soporte. Adaptada de imagen en el dominio público, procedente de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscopio_de_fuerza_atomica_esquema_v2.svg*

9.5. Resonancia de plasmones de superficie (SPR)

Esta técnica (*surface plasmon resonance*), sin entrar en detalles que no corresponden a los objetivos de este capítulo, utiliza un fenómeno físico mensurable cuando se hace incidir una radiación lumínica sobre una superficie, que responde a la adsorción de materiales sobre dicha superficie. Es un requisito que el soporte de la matriz sea metálico (habitualmente, un recubrimiento de oro). Concretamente, se detectan los cambios en el índice de refracción del medio adyacente al soporte metálico, debidos a las biomoléculas capturadas sobre la matriz (Figura 17). De hecho, la señal depende de la concentración de dichas moléculas y puede registrarse en tiempo real, por lo que es posible incluso medir velocidades de asociación y disociación y constantes de afinidad (aunque estas posibilidades corresponden más bien al empleo de biosensores que al de micromatrices, debido al número de muestras a analizar). Además, no requiere la unión de etiqueta marcadora alguna.

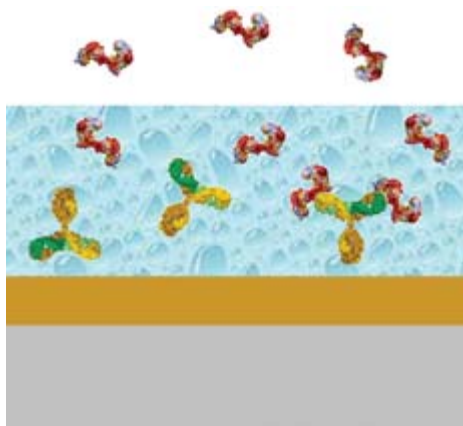


FIGURA 17. **Preparación para la detección mediante resonancia de plasmones de superficie.** El soporte (por ejemplo, un porta de vidrio) se recubre con una capa de oro (de unos 50 nm de espesor). Las moléculas de captura (en este ejemplo, anticuerpos) se pueden fijar al oro directamente o bien quedar absorbidas o ancladas de forma covalente a un hidrogel (de 100 a 200 nm) de un polímero como el carboximetildextrano. Con esta técnica es posible detectar cantidades de proteína en torno a 50 pg/mm².

9.6. Otros

Aunque cada vez tienen menos incidencia, es posible utilizar otras aproximaciones para la detección, tales como ensayos similares a ELISA, donde la señal es el producto coloreado o luminiscente de una reacción catalizada por la enzima que actúa de marcador, o el uso de radioisótopos y la detección por autorradiografía, bien con película o digital.

9.7. Detección sin marca

Se aplica este calificativo a los métodos que no precisan de la introducción de una molécula marcadora o etiqueta unida a la sonda o a la muestra. Entre ellos, cabe mencionar la microscopía de fuerza atómica, la espectrometría de masas y la resonancia de plasmones de superficie, descritos anteriormente.

10. MATRICES DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Dos son los diseños más comunes de matrices de moléculas de ácido nucleico: las que portan oligonucleótidos sintetizados químicamente y las formadas con muestras biológicas de ácido nucleico fijadas al soporte. Para una panorámica conjunta de las técnicas y aplicaciones pueden consultarse (4-8).

10.1. Matrices de oligonucleótidos

En este primer planteamiento, la matriz se forma con colecciones de oligonucleótidos generados *in situ*, es decir, mediante síntesis química y anclados de forma covalente al soporte tanto desde el comienzo de su síntesis como durante todo el ensayo posterior. Las secuencias de dichos oligonucleótidos se diseñan para corresponder con las que interesa detectar en las muestras de DNA o RNA. Este es el caso en el que el término *chip* de DNA tiene su mayor implantación (Figura 18).

10.1.1. *Matrices de genotipado*

Una de las principales aplicaciones de estas matrices es el mapeo de mutaciones y el análisis de polimorfismos. En este caso las matrices se emplean para analizar muestras de DNA genómico, con el fin de diagnosticar una enfermedad o, más comúnmente, para evaluar la predisposición a una enfermedad o su prognosis y, asimismo, para la tipificación o clasificación molecular de subtipos de cáncer y de otras enfermedades.

Veamos un ejemplo que lo ilustra. Estudios previos han llevado a conocer unas centenas de loci que presentan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con la hipercolesterolemia familiar, así como las distintas variantes alélicas presentes en la población en cada uno de esos loci y la incidencia de cada uno de estos alelos sobre la evolución de la hipercolesterolemia. Se procede a diseñar secuencias de unos 20 nucleótidos de longitud, de modo que sean complementarias a los distintos alelos para cada SNP. Se sintetizan entonces dichos oligonucleótidos *in situ* sobre las distintas posiciones de una matriz, o bien se sintetizan por separado y se aplican al soporte con alguna de las técnicas de impresión. Cada posición de la matriz contiene, obviamente, múltiples moléculas de oligonucleótido con una de las secuencias en concreto.



FIGURA 18. **Un chip de DNA comercial**, matriz de oligonucleótidos sintetizados *in situ* empleando fotolitografía sobre un soporte de vidrio modificado. Imagen en el dominio público, procedente de <http://images.niams.nih.gov/detail.cfm?id=140>

A partir de sangre o frotis bucal de los pacientes se extrae el DNA genómico, que se amplifica por PCR con cebadores diseñados para la región próxima a cada SNP. El producto de esta PCR múltiplex se marca con un nucleótido biotinilado, bien durante la PCR o —emplean-

do transferasa terminal— tras finalizarla. A continuación se realiza la hibridación de las muestras de DNA amplificado con la matriz de oligonucleótidos, y se revela empleando estreptavidina conjugada con un fluoróforo. El análisis de la fluorescencia obtenida en cada punto de la matriz permite interpretar cuál de los alelos de cada SNP está presente en el genoma del paciente. El ensayo permite así no sólo el diagnóstico, sino especialmente la prevención, la evaluación de riesgos y la elección de la terapia más adecuada a cada caso. Asimismo, el conjunto de datos que se va obteniendo permite incrementar el corpus de conocimiento sobre la relación entre cada una de las variantes alélicas y la evolución de la hipercolesterolemia.

10.1.2. *Matrices de expresión*

Otro gran campo de aplicación lo constituyen los ensayos de expresión génica. En este caso, las muestras analizadas corresponden al RNA expresado en el tejido de interés. La cuantificación de la señal en la matriz ofrece información sobre la actividad relativa de los genes para los cuales se hayan diseñado los oligonucleótidos componentes de la matriz.

En una de las aplicaciones más comunes, el llamado **análisis de expresión diferencial**, se preparan muestras a partir del mRNA. Por ejemplo, pueden compararse muestras de individuos sanos con las de quienes padecen una enfermedad, o bien muestras obtenidas de enfermos que padecen dos tipos de cáncer diferentes. El objetivo es identificar genes relacionados con la aparición de la enfermedad o con uno de sus subtipos. De cada una de las muestras se purifica el mRNA total y se realiza *in vitro* una transcripción inversa para obtener el conjunto de moléculas de DNA complementario. Bien durante la propia reacción de retrotranscripción o bien tras terminarla se marcan los cDNA con un fluoróforo, diferente para cada una de las dos muestras que se quieren comparar. La matriz de oligonucleótidos se construye con secuencias correspondientes a los genes de interés, cuya expresión se pretende analizar, o bien con una biblioteca de secuencias aleatorias (pero conocidas), si es que se persigue la búsqueda de genes cuya implicación en la enfermedad es aún desconocida. Ambas muestras de cDNA marcado se mezclan y se aplican sobre la matriz en un ensayo de hibridación. La detección de la intensidad relativa de la fluorescencia en ambos colores

para cada punto de la matriz (Figura 19) proporciona la información de qué genes están sobreexpresados en una de las dos muestras, cuáles reprimidos o expresados más débilmente y cuáles no ven modificada su expresión y, en consecuencia, no tienen implicación en la enfermedad estudiada o en los subtipos comparados.

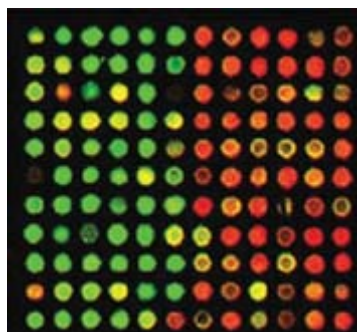


FIGURA 19. *Análisis de expresión diferencial mediante matriz de oligonucleótidos y detección de fluorescencia.* La presentación de los resultados de fluorescencia se realiza habitualmente codificando en rojo y en verde la emisión de ambos fluoróforos, de modo que se observan estos colores, respectivamente, en las posiciones donde hay sobre- o subexpresión del gen y color amarillo en las posiciones donde la expresión es similar en ambas muestras. Figura adaptada de la Figura 1 en Jessen et al. (2004) *Breast Cancer Res.* 6:R157, <http://breast-cancer-research.com/content/6/3/R157> © 2004 Jessen et al., licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

10.2. Matrices de ácidos nucleicos

Otra aproximación con abundantes ejemplos de aplicación consiste en preparar las matrices con fragmentos de moléculas de ácido nucleico depositados sobre el soporte. Dichos fragmentos suelen proceder de muestras biológicas o de técnicas de clonación. En algunos casos se eligen por ser representativos de secuencias que interesa analizar, por ejemplo para buscar las diferencias genéticas entre pacientes enfermos e individuos sanos. En otros casos, lo que se fija en la matriz es un conjunto de muestras distintas sobre las que se desea localizar una secuencia o ensayar una actividad bioquímica, como puede ser el reconocimiento por una proteína. Como ejemplo, esto permite la búsqueda de factores de transcripción para una secuencia promotora.

Dependiendo de la aplicación perseguida, las moléculas de DNA candidatas, inmovilizadas en la matriz, se hacen interaccionar con DNA o RNA (ensayo de hibridación), o bien con un extracto proteico (ensayo de unión o reconocimiento proteína-DNA).

11. MATRICES DE PROTEÍNAS

A pesar del éxito de las micromatrices de DNA, por ejemplo, en el estudio de perfiles de expresión génica y en el mapeo de mutaciones, la manifestación de la función de los genes se encuentra a la postre en la actividad de las proteínas que codifican. Por ello, la preparación de matrices de proteínas es un medio prometedor para el análisis de la función génica y de su regulación, y para aplicaciones diversas (9-13). Sin embargo, la preparación de estas matrices presenta retos tecnológicos superiores a las de ácidos nucleicos, pues la funcionalidad de las proteínas depende fuertemente de su conformación tridimensional y a menudo de otros factores, como las modificaciones postraduccionales, la asociación con otras proteínas o la localización subcelular, factores presentes en su entorno biológico pero que pueden verse alterados al fijar las proteínas al soporte y en las condiciones de ensayo.

Como precursores del desarrollo de las matrices de proteínas, pueden mencionarse las micromatrices de DNA, las técnicas de separación y análisis —cromatografía, electroforesis, espectrometría de masas— y su evolución para aplicarlas en proteómica y, finalmente, los inmunoensayos. Esto significa que gran parte de los elementos implicados en el diseño y el uso de las matrices de proteínas son equivalentes a los que forman parte de dichas técnicas precursoras.

En muchos casos, el planteamiento del ensayo consiste en analizar una mezcla compleja de proteínas, tal como un lisado celular, empleando la matriz para detectar y, si es posible, cuantificar, ciertas proteínas de interés. En esta situación, el factor clave es el mecanismo de captura de dichas proteínas por interacción con las existentes en la matriz. Existen métodos poco específicos, que aplican principios similares a una cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico o de fase inversa). Se aplica la muestra sobre la matriz, las proteínas se adhieren en mayor o menor medida, y se revela por ejemplo con un anticuerpo, específico para

las proteínas diana, etiquetado con un fluoróforo. Se puede, obviamente, acudir a métodos más específicos, basados en la interacción de las proteínas diana con un anticuerpo, un antígeno, un sustrato enzimático, un nucleótido u otras proteínas, según los casos. Estas últimas moléculas actuarán como moléculas de captura y deben haber sido fijadas previamente al soporte constituyendo la matriz.

Aunque la metodología y los diseños de ensayo expuestos anteriormente son aplicables al desarrollo de matrices de proteínas, dos son las principales consideraciones que condicionan la eficacia de éstas y la elección del diseño de la matriz y del ensayo: en primer lugar, existe la posibilidad de que tanto la inmovilización como la conjugación de grupos químicos o «etiquetas» utilizados para la detección alteren la conformación nativa de la proteína o su funcionalidad. Asimismo, puede ser limitante conseguir la orientación sobre el soporte adecuada para su interacción con las moléculas de la muestra analizada. En segundo lugar, en el caso frecuente de utilizar anticuerpos bien para la inmovilización (captura) o bien para la detección, el factor crítico es la disponibilidad de anticuerpos adecuados para todas las proteínas implicadas en el ensayo y la capacidad de éstos para interactuar sin interferir con el resto de componentes y etapas del ensayo.

En lo concerniente al diseño de los componentes de la matriz, podemos distinguir tres aproximaciones:

- a) **Matrices de anticuerpos.** Fijando en el soporte un surtido de anticuerpos específico para las proteínas que se pretende estudiar, se podrán capturar éstas desde la muestra analizada. Este es uno de los diseños más frecuentes. El problema principal es el requisito de obtener numerosos anticuerpos (al menos uno para cada proteína de interés) con afinidad y especificidad suficientes.
- b) **Matrices de proteínas diana.** Otra forma de plantear el ensayo es fijar en la matriz una serie de proteínas con las que se quiere ensayar alguna actividad, como la unión a ácidos nucleicos (por ejemplo, para identificar dianas de factores de transcripción) o encontrar qué proteínas de la muestra interactúan con ellas. En este caso, la limitación es conseguir la purificación de las proteínas de captura.

- c) **Matrices de bibliotecas de proteínas** recombinantes, obtenidas a partir de genotecas de clones de expresión. La purificación de estas proteínas es menos problemática, pues se puede acudir a etiquetas de afinidad introducidas durante la clonación (como la 6xHis descrita anteriormente), quedando la cuestión de que las proteínas recombinantes adopten la estructura nativa.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Lausted, C. G., Warren, C. B., Hood, L. E. & Lasky, S. R. (2006) Printing your own inkjet microarrays. *Meth. Enzymol.* **410**: 168-189.
2. Dalma-Weiszhausz, D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y. & Miyada, C. G. (2006) The Affymetrix GeneChip® platform: An overview. *Meth. Enzymol.* **410**: 3-28.
3. Dolan DNA Learning Center. GeneChips®. En: *Biology Animation Library, Gene Almanac*. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/dnachip.html> (consultado el 23-4-09).
4. Mocklera, T. C. & Ecker, J. R. (2005) Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* **85**: 1-15.
5. Peeters, J. K. & Van der Spek, P. J. (2005) Growing applications and advancements in microarray technology and analysis tools. *Cell Biochem. Biophys.* **43**: 149-166.
6. Hoheisel, J. D. (2006) Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nature Rev. Genet.* **7**: 200-210.
7. Bier F. F., von Nickisch-Rosenegk, M., Ehrentreich-Förster, E., Reiß, E., Henkel, J., Strehlow, R. & Andresen, D. (2008) DNA microarrays. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **109**: 433-453.
8. Sáenz, A. & López de Munain, A. (2008) Matrices de ADN: visión general y aplicaciones específicas. *Med. Clin. (Barc.)* **130**: 504-509.
9. MacBeath, G. & Schreiber, S. L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**: 1760-1763.
10. Talapatra, A., Rouse, R. & Hardiman, G. (2002) Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics* **3**: 1-10.
11. Zhu, H. & Snyder, M. (2003) Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**: 55-63.
12. Bertone, P. & Snyder, M. (2005) Advances in functional protein microarray technology. *FEBS Journal* **272**: 5400-5411.
13. Spurrier, B., Honkanen, P., Holway, A., Kumamoto, K., Terashima, M., Take-noshita, S., Wakabayashi, G., Austin, J. & Nishizuka, S. (2008) Protein and lysate array technologies in cancer research. *Biotechnol. Adv.* **26**: 361-369.