

## **Introducción a los microarrays y a su uso potencial en patología.**

**Dr. J. Palacios.**

**Grupo de Cáncer Mamario Y Ginecológico. CNIO. Madrid**

Los microarrays de DNA son soportes sólidos en los que moléculas de DNA de cadena simple (cDNA u oligonucleotidos de entre 25-70 pares de bases) se fijan y permiten identificar por hibridación la expresión de multitud de genes de una muestra biológica. El proceso general de análisis con arrays consiste en el aislamiento de RNA de tejido normal y de una muestra de referencia, síntesis de cDNA y marcaje de dos colorantes fluorescentes (Cy3 y Cy5) para la muestra problema y la referencia respectivamente, e hibridación sobre el array. La diferencia de expresión de RNA entre ambos tejidos se puede evaluar a partir de la relación Cy3/Cy5 para cada gen. El análisis nos permite definir el perfil o patrón de expresión génica de cada muestra concreta.

El procesamiento del tejido esencial para conseguir suficiente cantidad y calidad de RNA. No obstante, distintos protocolos de extracción seguidos de amplificación lineal del ARN permiten el análisis de casi cualquier tipo de muestra: biopsias, biopsias con aguja, citologías, tejidos microdisecados, etc (Ellis *et al*, 2002; Puztai *et al*, 2003).

Las principales aplicaciones de los arrays de ADN en cáncer son: la clasificación molecular de neoplasias morfológicamente similares pero con comportamiento biológico heterogéneo, la evaluación del pronóstico y la respuesta al tratamiento.

Respecto al primer uso, son clásicos los estudios de Alizabeh *et al* (2000) y Rosenwald *et al* (2002) que analizaron pacientes con linfomas B difusos de células B grandes (DLBCL) con morfología similar, demostrando que existían dos grandes grupos con pronóstico distinto: los tumores con perfiles similares al de células B del centro germinal tenían un mejor pronóstico que aquellos con perfiles similares a los de células B periféricas activadas.

Dos estudios de gran trascendencia clínica relacionados con el uso de arrays en cáncer para evaluar el pronóstico han sido publicados por el grupo del Instituto del Cáncer de Holanda, en relación con el cáncer de mama. En su estudio inicial (van 't Veer *et al*, 2002), los autores analizaron un grupo de 98 pacientes N0, menores de 55 años, sin tratamiento adyuvante con quimioterapia, 34 de las cuales desarrollaron metástasis a distancia en un periodo de 5 años. El perfil de expresión

fue analizado con un array que contenía 25.000 genes aproximadamente. Tras un análisis estadístico supervisado, los autores identificaron un grupo de 70 genes cuya expresión en el tumor produce una firma genética de buen o mal pronóstico, estimándose que los tumores con la firma de mal pronóstico tienen una probabilidad de metastatizar 28 veces mayor que los que poseen el patrón de expresión de buen pronóstico. Algunos de los genes incluidos en esta firma molecular están involucrados en procesos tales como el ciclo celular, invasión, metástasis y angiogénesis (ciclina E, MMP9, RAB6B, FLT9, etc.) Los autores comparan de forma empírica su modelo de predicción de pronóstico con los criterios propuestos por los consensos de St Gallen y el NIH para la indicación de quimioterapia en pacientes N0 y comprueban que la firma molecular seleccionaría de forma más adecuada las pacientes que se beneficiarían del tratamiento, así como aquellas a las que no haría falta tratar. En un estudio posterior (van de Vijver *et al*, 2002), se usa la firma molecular basada en los 70 genes descritos inicialmente para evaluar la evolución de un grupo de 295 pacientes menores de 55 años de edad con cáncer de mama (151 de las cuales eran N0), analizando de forma más específica el valor de esta firma en la predicción del desarrollo de metástasis a distancia en los primeros 5 años de evolución. En esta serie más amplia, los resultados indican que la firma molecular de buen pronóstico se relaciona con un menor riesgo de metástasis a los 5 años y con una supervivencia significativamente mayor, el grupo total y en los subgrupos N0 y N+. Además, se vuelve a confirmar la mayor capacidad de predicción del patrón de expresión genética que los criterios de riesgo de St Gallen y el NIH en el subgrupo N0. Así mismo, desde un punto de vista biológico, se sugiere que las alteraciones moleculares que definen la capacidad de metástasis a distancia por vía hematogena de un determinado cáncer de mama son precoces y diferentes a las implicadas en las metástasis por vía linfática.

Sin embargo, un estudio reciente en el que se investigan los genes implicados en la producción de metástasis óseas por la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, sugiere que, además del perfil de mal pronóstico, se requiere el funcionamiento de un grupo adicional de genes implicados en distintos procesos tales como "bone-homing" (CXCR4), angiogénesis (FGF5, CTGF), diferenciación de osteoclastos (IL11) y osteolisis (MMP1), para que se desarrolle la metástasis en el hueso. Los autores sugieren que el tumor originario es una población heterogénea que contiene células con diversas combinaciones de genes implicados en el desarrollo de

metástasis óseas. La producción de lesiones metastásicas estaría en relación con la llegada al hueso de células que sobreexpresen un número suficiente de genes implicados en este proceso, cuya función se complemente. Así mismo se indica el carácter específico de los genes implicados en la metástasis en distintos órganos, siendo diferentes los implicados, por ejemplo, en las metástasis óseas frente a las de glándula suprarrenal.

En cáncer de próstata, Singh *et al* (2002) identificaron mediante arrays 5 genes pronósticos comparando pacientes libres de enfermedad y pacientes con recaída (dos aumentos sucesivos de PSA): cromogranina, PDGF- $\beta$ , HOXC6, receptor de inositol trifosfato y sialiltransferasa.

En relación con la predicción de la respuesta al tratamiento, Ma *et al* (2004) encontraron 19 genes que se expresaban diferencialmente en pacientes con cáncer de mama respondedores y resistentes a tamoxifeno. La relación entre la expresión de dos genes, HOXB13 e IL17BR, mostraba una capacidad predictora mayor que la que proporcionaban ER y PR. Otros estudios han evaluado la utilidad de los perfiles de expresión genética para predecir la respuesta a distintas pautas de quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama (Chang *et al*, 2003; Ayers, *et al*, 2004)

Antes de aplicar los arrays al uso clínico se deben superar varios obstáculos. Primero la reproducibilidad del método. Lee *et al* (2000) recomienda hacer un mínimo de tres replicados por muestra, y otros autores (Mcgregor y Squire, 2002) proponen que cada muestra ha de hibridarse por duplicado utilizando cada uno de los dos fluorocromos (Cy3 y Cy5). Se requiere así mismo estandarización de los procedimientos, desde la extracción de ARN, sistemas de marcaje y uso de muestras de referencia común. Finalmente, es necesaria una simplificación de la tecnología, como por ejemplo la utilización de arrays con bajo número de genes específicos para estudios concretos. La validación sería el último peldaño para la aplicación clínica de los arrays. Hasta el momento, muy pocos estudios han realizado validación de los resultados en series independientes, análisis estadísticos ajustados o comparación con factores pronóstico conocidos; además, el número de pacientes en la mayor parte de las series es muy pequeño, lo que hace que los resultados sean poco significativos.

## **Referencias**

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.

Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K, Lecoche M, Metivier J, Booser D, Ibrahim N, Valero V, Royce M, Arun B, Whitman G, Ross J, Sneige N, Hortobagyi GN, Pusztai L. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2284-93.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003;362:362-9.

Ellis M, Davis N, Coop A, Liu M, Schumaker L, Lee RY, Srikanthana R, Russell CG, Singh B, Miller WR, Stearns V, Pennanen M, Tsangaris T, Gallagher A, Liu A, Zwart A, Hayes DF, Lippman ME, Wang Y, Clarke R. Development and validation of a method for using breast core needle biopsies for gene expression microarray analyses. *Clin Cancer Res* 2002;8:1155-66.

Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA, Sklar J. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9834-9.

Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* 2002;48:1170-7.

Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, Damokosh A, Sneige N, Buchholz TA, Esteva FJ, Arun B, Cristofanilli M, Booser D, Rosales M, Valero V, Adams C, Hortobagyi GN, Symmans WF. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:2406-15.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.

Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, Lander ES, Loda M, Kantoff PW, Golub TR, Sellers WR. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* 2002;1:203-9.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1999-2009.