

Continguts: www.acclc.cat/ivv_docs.php?any=2015*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php**Actes-resums****Resum de la setena sessió del III Curs d'actualització en ciències de Laboratori Clínic: "Micromatrius: procediments i aplicacions"**

Mar Mallo Fajula

Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Campus Can Ruti, Badalona

El 20 de maig de 2015 va tenir lloc, a la seu del Col·legi Oficial de Farmacèutics de Barcelona, la sisena sessió del III Curs d'actualització en ciències de Laboratori Clínic: "Micromatrius: procediments i aplicacions" impartida per Mar Mallo Fajula, de l'Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Campus de Can Ruti, Badalona.

2015 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

Els estudis de citogenètica han anat evolucionant d'ençà que van aparèixer en els anys seixanta. El bandeig de bandes G (amb reactiu de Giemsa) permet una visualització de l'estructura cromosòmica i, en conseqüència, la seva caracterització. El seu principal avantatge és la visualització de tots els cromosomes en un únic estudi. Tot i això, presenta algunes limitacions, com la seva baixa resolució (10 Mb), i la necessitat de mostres recents per tal que els cromosomes estiguin en estadi de metafase.

Als anys 2000, van aparèixer els procediments basats en micromatrius (*microarray* en anglès). Una micromatriu és un conjunt de molècules disposades ortogonalment en files i columnes sobre un suport sòlid. En funció del tipus de la mostra dipositada sobre l'esmentat suport, es poden distingir micromatrius genòmiques (amb ADN), d'expressió (amb ARN), de teixit fixat en parafina, de proteïnes o de cèl·lules.

Existeixen dos tipus de micromatrius genòmiques: micromatrius d'hibridació genòmica comparativa (d'ara endavant, HGC) i micromatrius d'SNP (acrònim de l'anglès *single nucleotide polymorphism*).

Les micromatrius d'HGC segueixen el mateix principi que les matrius d'HGC convencionals amb diferent suport per la hibridació. En lloc de realitzar la hibridació sobre un portaobjectes, es realitza sobre un suport on es disposen milions de sondes de nucleòtids BACs (acrònim de l'anglès *bacterial artificial chromosome*) o oligonucleòtids, abastant tot el genoma o una regió concreta.

Actualment també s'utilitzen les micromatrius d'SNP que, a més de detectar guanys i pèrdues, permeten identificar pèrdues d'heterozigositat (d'ara endavant, LOH) que no impliquen alteracions numèriques en el genoma.

Aquests procediments permeten un estudi global del genoma amb una major resolució, de fins a 50 Kb. Una de les limitacions de les micromatrius genòmiques és la baixa sensibilitat, ja que,

per a identificar una alteració, es requereix que la mostra contingui un mínim de 20 % de cèl·lules tumorals. A més, no permeten detectar alteracions equilibrades, ni distingir clons individuals.

Un punt important a tenir en compte és el tipus de mostra, que en el cas de les malalties hematològiques, és la sang perifèrica o la mèdula òssia (d'extracció recent o congelada), i per a tumors sòlids, és el teixit tumoral (d'extracció recent, congelat o parafinat). En el cas de teixit parafinat, cal anar amb compte, perquè l'ADN pot estar degradat. El següent pas és l'elecció del teixit control, per tal de determinar si les alteracions detectades en la mostra tumoral són adquirides, o ja presents en la línia germinal del pacient. Els controls poden ser una mescla d'ADN propi (obtingut a partir de la sang perifèrica de voluntaris sans), una mescla d'ADN comercial o ADN del mateix pacient (limfòcits CD3+ en malalties no limfoides, teixit sa adjacent com la pell, o cèl·lules de la mucosa bucal). L'ADN del mateix pacient és el teixit control ideal ja que permet descartar alteracions de la línia germinal.

La limitació d'aquests procediments són aquelles malalties que es caracteritzen per presentar canvis en el nombre de còpies. No obstant, fins el moment, en el diagnòstic hematològic, és una eina destinada exclusivament a la investigació. En els estudis prenatals i postnatales, s'aplica actualment en el diagnòstic de forma habitual.

Cadascun dels procediments de la citogenètica molecular presenta avantatges i inconvenients i són complementaris. La Taula 1 en mostra un resum. Sempre cal escollir el procediment que millor s'adapti a les nostres necessitats.

Procediment	Resolució	Sensibilitat	Detecció d'LOH	Cèl·lules en divisió	Clons individuals	Detecció de noves alteracions	Lesions no equilibrades
<i>Citogenètica convencional</i>	Baixa	10 %	No	Sí	Sí	Sí	Sí
<i>FISH</i>	Baixa	Alta	No	No	Sí	No	No
<i>Micromatrius d'SNP</i>	Alta	20-30 %	Sí	No	No	Sí	No
<i>Micromatrius d'HGC</i>	Alta	20-30 %	No	No	No	No	No

Taula 1. Taula comparativa dels procediments de citogenètica (1).

FISH: acrònim de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*.

Les micromatrius d'expressió permeten l'anàlisi simultània de l'expressió de milers de gens o de miARN per conèixer el perfil molecular i les xarxes genètiques que defineixen un tipus cel·lular.

L'anàlisi el porten a terme titulats bioinformàtics i requereix formació i experiència. En tot estudi de les micromatrius d'expressió, el primer pas és l'anàlisi no supervisada, en què no es coneix prèviament a quina categoria o grup pertany cada mostra de l'estudi, amb l'objectiu d'identificar subgrups de tumors que comparteixen patrons d'expressió semblants.

L'anàlisi supervisada es basa en la identificació de gens diferencialment expressats entre dues categories conegudes i, d'aquesta forma, classificar altres mostres de categoria prèviament desconeguda. Aquesta anàlisi s'usa per poder correlacionar dades d'expressió i dades clíniques.

El bon diagnòstic genètic requereix conèixer el rediment que pot obtenir-se amb cadascun dels procediments i fer-ne un bon ús utilitzant les diferents opcions disponibles en el mercat.

Bibliografia

(1) Maciejewski J, Tiu R, O'Keefe C, Application of array-based whole genome ccaning technologies as a cytogenetic tool in hematologic malignancies. *Br J Haematol* 2009;146(5):479-88.