

Microarreglos: Tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana

M en C Edgar Alejandro Medina-Torres,* Dr. Francisco Espinosa-Rosales*

RESUMEN

La tecnología de microarreglos es una herramienta poderosa en el campo de la investigación biomédica, debido a que permite analizar diferentes tipos de muestras biológicas (tejidos, proteínas y material genético) y miles de moléculas de manera simultánea por ensayo, a diferencia de lo que ocurre con otras técnicas de biología molecular (RT-PCR, PCR, Western blot, Northern blot, Southern blot) en las cuales sólo se pueden analizar un número limitado de moléculas por ensayo.

La versatilidad de esta técnica permite utilizarla en estudios de dosis-respuesta, para establecer perfiles de expresión diferencial de genes en condiciones experimentales distintas (enfermedades, tratamientos, etc.), en el análisis de polimorfismos, presencia de metilaciones, mutaciones puntuales, identificación de blancos terapéuticos, etc.

Este tipo de ensayos proporcionan información muy valiosa en diferentes campos de la investigación biomédica, pero el desconocimiento de las aplicaciones y los elevados costos de las pruebas hacen que algunos investigadores no utilicen esta tecnología.

El desarrollo de nuevas plataformas, la aplicación de nuevas tecnologías de detección y la implementación y mejora de las ya existentes, ofrecen un panorama muy alentador en el desarrollo de una técnica que puede ofrecer mayor sensibilidad en estudios a nivel de genoma.

Palabras clave: Pruebas diagnóstico, biología molecular, microarreglos.

ABSTRACT

Microarrays technology is a powerful research tool, them allow us to design trials with many kinds of biological samples (proteins, nucleic acids and tissues), in each trial thousand of molecules can be evaluated simultaneously, in another hand with techniques like PCR, RT-PCR, western blot, northern blot, southern blot, only a few number of molecules can be evaluated by assay.

Microarrays technique, allow us to study genetic expression profiles in different experimental conditions (illness, drug treatment, etc.), in order to found polimorfisms, DNA methylations, punctual mutations and to identify pharmaceutic targets.

This kind of test provides us valuable information, but ignorance about its research applications and the expensive material required to execute microarrays technology in the laboratory, are facts that limit their use in the research laboratory.

Development of new microarray platforms, and improvement of new detectors systems, promise that microarrays will be trials more sensitive and with many news applications in the genomic field.

Key words: Diagnostic tests, molecular biology, microarrays.

* Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias Primarias, INP.

INTRODUCCIÓN

A partir del establecimiento y desarrollo de la biología molecular se han logrado grandes avances en diversos campos del conocimiento como la medicina, genética, bioquímica y biología, y de la misma manera ha contribuido a consolidar y establecer nuevas disciplinas científicas como la inmunología, la proteómica y la genómica entre otras.

Con la aparición de nuevas tecnologías y el desarrollo de técnicas como la electroforesis en la década de los 30's, el Southern Blot (1975) (Southern E, 1975), northern blot (1977), las técnicas de secuenciación de Sanger (1975) y de Gilbert (1977) y en 1986 la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de Kary Mullis, así como las técnicas de transformación bacteriana sentaron las bases para poder realizar estudios a nivel de expresión de genes.

Con los conocimientos alcanzados con las técnicas anteriormente mencionadas y el perfeccionamiento y adaptación de las mismas se sentaron las bases técnicas y tecnológicas para poder establecer uno de los proyectos más ambiciosos y relevantes del siglo pasado, el Proyecto Genoma (1990-2003).

Los resultados obtenidos, permitieron sentar las bases para desarrollar una técnica con mayor poder de análisis y que en combinación con los avances en proteómica se obtiene una herramienta de investigación y diagnóstico muy poderosa como son los arreglos de ácidos nucleicos y proteínas.

Los arreglos o macroarreglos requerían para su construcción la adsorción o fijación en un soporte sólido de pequeños fragmentos conocidos de secuencias de DNA o RNA o bien proteínas o fragmentos de las mismas, sin embargo por las limitaciones tecnológicas las plataformas sólo podían contener unas cuantas decenas de secuencias, pero a pesar de eso esta tecnología representó un gran avance en el estudio de expresión de genes.

Como resultado del Proyecto Genoma se construyeron bibliotecas genéticas de diferentes organismos (incluyendo el genoma humano) las cuales se implementaron en el diseño de arreglos que contaban con un mayor número de genes a evaluar.

Si bien los arreglos son herramientas que se han empleado desde hace algunos años, la innovación de esta nueva generación de arreglos radica en la miniaturización y el aumento en la densidad de secuencias que podemos encontrar por unidad de área del soporte sólido, lo que trajo como consecuencia que se puedan evaluar de manera simultánea varios miles de genes; por estos motivos es que los microarreglos tienen un gran potencial de aplicación en los más diversos rubros de la investigación y diagnóstico clínico.

MICROARREGLOS

Los microarreglos son en la actualidad una poderosa herramienta de análisis de expresión de genes debido al mayor número de secuencias que se pueden analizar por prueba y tienen grandes ventajas sobre otras técnicas como la PCR convencional, la RT-PCR y la PCR en tiempo real, en las cuales sólo se pueden analizar un número muy limitado de genes de manera simultánea, debido a que en la mayoría de los casos que se requiere montar un ensayo por cada gen a analizar.

En términos generales, un microarreglo se encuentra integrado por dos partes, el material biológico o sintético denominado como prueba y el soporte sólido en el cual se inmovilizan o adsorbe el material biológico; este material puede ser de distintas naturalezas; entre los materiales más usados encontramos plástico, vidrio, gel, silicón, membranas porosas y oro (Napoli C, et al; 2003).

Los microarreglos pueden clasificarse en dos grandes grupos: los biomicroarreglos (biochips) y los microarreglos químicos; los primeros están constituidos por material biológico (ácidos nucleicos, enzimas, anticuerpos, células, tejidos, etc.); mientras que los segundos consisten en la inmovilización de moléculas de origen sintético en el soporte.

Los biochips pueden obtenerse de diferentes maneras, las más comunes consisten en la adsorción o unión química del material obtenido de bibliotecas de genes o de material aislado y tratado previamente como en el caso de las células, tejidos y proteínas; por otra parte también pueden realizarse síntesis *«in situ»* de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos que quieren colocarse en el soporte (Xu Q y Lam K, 2003).

En la investigación clínica los microarreglos de DNA son los más usados debido a que las aplicaciones son diversas y bien pueden ajustarse para explorar el perfil de expresión de genes en un organismo en diferentes circunstancias biológicas y terapéuticas.

Dadas las características de manufacturación de los microarreglos que usan proteínas y DNA, podemos definirlos de manera operativa como: «una impresión ordenada de material biológico en una superficie sólida cuya aplicación radica en la evaluación simultánea de cientos de moléculas en una muestra obtenida a partir de los más diversos sistemas biológicos».

Microarreglos de DNA

Es importante el tener presente que el trabajo con microarreglos de DNA inicia incluso antes de tener la muestra problema, la selección de las secuencias, así como el tipo de microarreglo a emplear, son importantes para que se obtenga el máximo de infor-

mación posible de acuerdo al tipo de problema que deseamos abordar.

El trabajo con microarreglos podemos dividirlo en cuatro etapas (*Figura 1*):

1. Selección del tipo de microarreglo y de las secuencias que se colocarán en el soporte.
2. Obtención de la muestra biológica.
 - 2.1 Purificación del DNA o RNA.
3. Amplificación del material genético (PCR).
 - 3.1 Marcaje de la muestra problema.
4. Hibridación del microarreglo.
 - 4.1 Captura de resultados.
 - 4.2 Análisis de resultados.

Como ya se ha mencionado, los microarreglos se componen básicamente de dos partes; el material biológico (DNA, proteínas, tejidos, etc.) y el soporte sólido. Sin embargo al momento de diseñar, fabricar y/o seleccionar el tipo de microarreglo a emplear, se deben realizar diversas consideraciones (*Cuadro 1*).

Elección del blanco de hibridación (tamaño de las secuencias)

Hablando específicamente de los microarreglos de DNA, se debe tener como principal criterio de selección el tipo de prueba que se va realizar. Se debe recordar que en este tipo de pruebas se fundamentan en la capacidad que tiene una cadena de DNA de acoplarse a su cadena complementaria de DNA (hibridación) y como finalmente este proceso implica la interacción molecular mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno entre los nucleótidos de ambas cadenas, la especificidad de unión de las cadenas, así también como la intensidad de la misma depende en gran medida de la longitud que tengan dichas cadenas.

Entre más grandes sean las diferencias entre las secuencias a evaluar se tienen menos probabilidades de que se presente una hibridación entre dos cadenas que no sean complementarias (hibridación inespecífica). La hibridación inespecífica depende

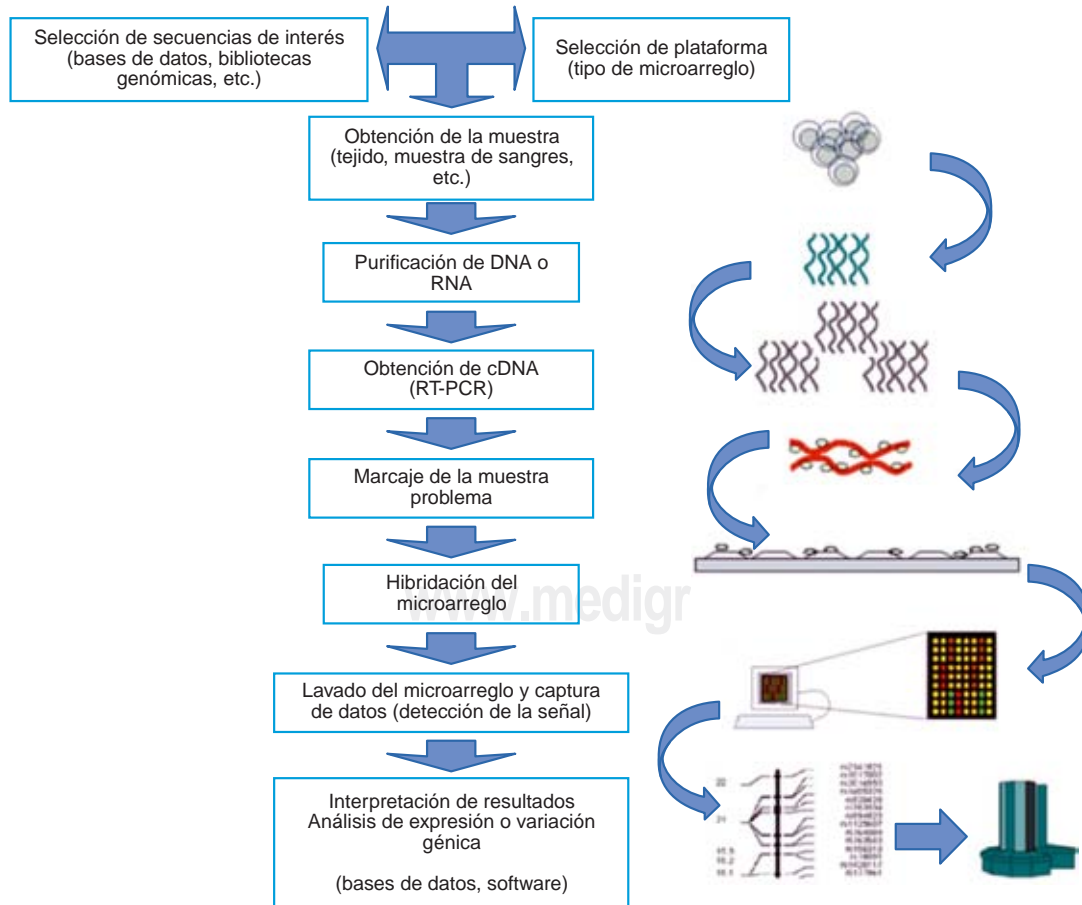


Figura 1. Esquema general de trabajo con microarreglos de DNA.

Cuadro I. Elementos a considerar al momento de diseñar, fabricar y/o seleccionar un microarreglo (Tomada y modificada de Microarrays y Biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA/CIBT-FGUAM 2002.

Consideración	Procedimiento
Elección del blanco de hibridación	cDNA, oligos, etc.
Marcaje de la muestra problema	Enzimático, fluorescencia, radiactividad, quimioluminiscencia, etc.
Elección de soporte	Membranas, vidrio, plástico, etc.
Inmovilización de la sonda	Activa, pasiva, etc.
Fabricación	Adsorción por contacto, síntesis « <i>in situ</i> », etc.
Captura de resultados	Digitalización, revelado, etc.
Análisis	Programas y bases de datos.

fundamentalmente de dos parámetros, la secuencia y la longitud de la cadena.

De manera que la selección del tamaño y la secuencia de nucleótidos de la sonda de hibridación o prueba, está sujeta al objetivo del estudio que se tiene; es así que las secuencias más cortas (oligos) se recomiendan cuando se buscan microRNA (Liu C, et al, 2008), polimorfismos o mutaciones puntuales, ya que los oligos permiten que la hibridación entre la prueba y el problema (muestra biológica aislada del sistema que se estudia) ocurra de tal manera que se reduzca la hibridación inespecífica.

Las secuencias de mayor tamaño (varios cientos de pares de bases) se emplearán con mayor frecuencia en estudios de expresión de genes, cuando se trate de establecer el número de copias (Bignell G, et al, 2006) o qué genes son los que se expresan de manera diferencial en dos o más condiciones específicas (tratamientos farmacológicos, infecciones, fases de una enfermedad, cinéticas, etc.).

Marcaje de la muestra problema

El marcaje de la muestra puede hacerse directamente o indirectamente, en el primer caso, se incorporan durante la síntesis de cDNA (amplificación del material genético por PCR) bases químicamente modificadas que llevan incorporadas moléculas que pueden ser detectadas por fluorescencia, radiactividad (Volpe E, et al, 2006) o fluorometría (*Cuadro II*).

Las principales ventajas de emplear el marcaje directo, radica principalmente en que no se necesitan reactivos adicionales para lograr la detección en el microarreglo, sin embargo las desventajas más grandes que se han observado al utilizar este tipo de técnicas son varias, entre las que destacan el bajo rendimiento en la obtención de los productos de amplificación.

Los fluorocromos al ser moléculas de gran tamaño que se encuentran unidas químicamente a los nucleótidos dificultan el proceso de incorporación enzimática de los mismos a la cadena que se elonga

durante el ciclo de amplificación de la PCR, interrumpiendo la síntesis de algunas copias de la cadena original de DNA, lo que tiene como consecuencia que se obtenga un menor número de copias que cuando se usan nucleótidos sin fluorocromo.

Otras desventajas del uso de técnicas de tinción directas son el uso de material radiactivo y la baja resolución que se obtienen al momento de capturar los resultados de la hibridación (cuando se usan isótopos radiactivos), la presencia de fluorescencia inespecífica con el uso de algunos soportes (como en el caso del plástico), etc.

En los **métodos indirectos**, de manera general se incorporan los marcadores después de que se ha amplificado por PCR el material genético. Se pueden incorporar moléculas que por sí solas no pueden ser detectadas y que requieren de un segundo paso en el cual se incorpora la molécula que permitirá la detección por alguno de los métodos previamente mencionados o bien usar nucleótidos químicamente modificados durante la PCR, a los cuales se les pueden unir los marcadores mediante una reacción química (*Cuadro II*).

Entre los métodos indirectos más usados destacan el sistema de indicadores como la biotina (la cual se incorpora a la sonda de hibridación) y posteriormente es revelada con la adición de avidina o estreptavidina conjugadas a fluorocromos (Fu, Li M; 2006) o bien el uso de una molécula susceptible de ser reconocida por un anticuerpo monoclonal que a su vez está unido a una enzima que puede catalizar una reacción en la que se produzca un producto luminescente (ejemplo: sistema digoxigenina (DIG)/anti-DIG).

Con el uso de los sistemas de marcaje indirecto se gana sensibilidad al momento de realizar la detección, además se cuenta con una amplia disponibilidad comercial de los sistemas de marcaje. Las principales desventajas de estos sistemas se reflejan en lo económico, pues se requiere de equipos de detección de mayor costo y de manera importante,

sobre todo se requiere de una mayor manipulación de la muestra para poder realizar el ensayo.

De acuerdo al tipo de marcaje que se haga de las muestras problema, se obtendrá un tipo específico de lectura; las comunes se describen en el *cuadro II*.

¿Cómo se fabrica un microarreglo?

Básicamente existen dos formas de fabricar el microarreglo, el primero de ellos consiste en la síntesis «*in situ*» de las sondas de hibridación y como ya se mencionó, esto puede hacerse mediante el uso de microelectrodos, los cuales están colocados en la lamina a manera de una especie de circuito electrónico.

La otra forma requiere del depósito de las sondas que fueron previamente sintetizadas, y son estas últimas las que tienen una mayor cantidad de métodos para cumplir con dicho objetivo. Entre los métodos más utilizados, encontramos los denominados «inyección de tinta» (por su similitud con el sistema que utilizan las impresoras).

Este sistema consiste en un sistema integrado por un capilar (aguja) y una bomba, la cual deposita un pequeño volumen (nanolitros) de la disolución de la sonda sobre el soporte sólido, realizando una microimpresión. En una variante de la misma técnica se utiliza una pequeña cantidad de cerámica localizada en las cercanías del capilar dosificador, la cual es fundida mediante la aplicación de un pulso eléctrico deformando el vidrio y casi de forma simultánea se deposita una pequeña cantidad de fluido (nanolitros) en el soporte.

Es importante recalcar que en estas dos técnicas, la disolución que contiene a la sonda está dentro de los capilares que dosifican la muestra y con la ayuda de un sistema de bombas se deposita una cantidad uniforme de material.

Una alternativa a los dos sistemas mencionados, implica que los capilares dosificadores sean sumer-

gidos en la disolución que contiene a la sonda de hibridación, posteriormente estos capilares hacen contacto con el soporte sólido dejando una microgota en la superficie del soporte dejando una impresión del mismo.

APLICACIONES DE MICROARREGLOS EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA.

Cada tipo de microarreglo ofrece ventajas y desventajas al momento de aplicarlo dentro del trabajo de investigación.

Los microarreglos de DNA en términos generales son empleados para detectar la expresión diferencial de genes en dos condiciones experimentales: terapéuticas o fisiológicas distintas. Las diferencias en el nivel de expresión de cada gen se determina en función del número de copias de mensajeros de RNA existentes en las muestras.

Así podemos encontrar reportes en los cuales se han empleado los microarreglos para cuantificar moléculas de RNA (Orntoft y Kruhøffer, 2006) y medir el número de copias de DNA presentes en un genoma (Snijders et al., 2001) y se ha demostrado que la aplicación de esta tecnología a la cuantificación del nivel de expresión de un gen es equiparable en resultados a los que se pueden alcanzar con técnicas como la PCR en tiempo real (Khun K., et al; 2004).

En microbiología se han usado para caracterizar cepas de microorganismos y establecer la presencia de factores de virulencia en cepas de interés clínico (Chizhikov V, et al; 2001), como en el caso de estudio sobre la expresión de genes en el parásito de malaria en donde se identificaron una serie de proteínas que no habían sido caracterizadas y que aparentemente desempeñan un papel importante en el proceso de infección y resistencia en las diferentes etapas del desarrollo de *Plasmodium falciparum* y con ayuda de modelos de estudio de interacción de

Cuadro II. Métodos de marcaje de la muestra problema.

	Método	Marcaje	Elemento de detección	Lectura
Directo	Enzimático	Fosfatasa alcalina, peroxidasa	Elemento cromogénico (absorción de radiación)	Espectrofotometría
	Isótopos radiactivos	$^{32}\text{P}^*$ o ^{125}I		
Indirecto	Fluorocromo	Cy3, Cy5, Fluoresceína	Radiación (emisión)	Auto-radiografía
	Químico	Biotina ¹	Luz (λ específica)	Fluorescencia
		Avidina, estreptavidina ^(revelador)	Luz (λ específica)	Fluorescencia
	Enzimático	DIG ^(marcador)		
		Anti-DIG y sustrato ^(revelador)	Luz (λ específica)	Fluorescencia Químio-luminiscencia

Nota: λ = longitud de onda

proteínas se puede predecir la función y la importancia de 946 nuevas proteínas (Zhou Y, et al; 2008) y con la información generada de estos estudios se pueden diseñar esquemas de tratamiento adecuados para tratar las infecciones con los microorganismos identificados.

También se han empleado para comparar los niveles de expresión de alelos con polimorfismos (Liljedahl, et al; 2004) y mutaciones (inserciones y deleciones de material genético), estudios de evolución, análisis farmacológicos (Katzukabe et al., 2005), cinéticas para el análisis transcripcional, etc. (Mantri-pragada et al., 2004).

En la clínica del trasplante han encontrado un gran campo de aplicación. El éxito de un trasplante de tejido radica en el manejo farmacológico adecuado y el identificar a tiempo las señales de rechazo por parte del organismo receptor.

En 2004 el grupo de Daniel R Salomón publicó el primer reporte completo con el cual hizo un estudio de expresión diferencial de genes entre muestras obtenidas de diferentes grupos de estudio, entre los que se encuentran los donadores de riñón como control, el grupo de trasplantados con una supervivencia del riñón de más de un año y pacientes que presentaron rechazo agudo del tejido; y las muestras consistieron en linfocitos de sangre periférica y biopsias de todos los pacientes.

Los pacientes que presentaron signos clínicos de rechazo agudo del riñón trasplantado presentaban sobreexpresión de genes relacionados con quimiotaxis como RANTES y receptores de quimiocinas con motivos C-X-C, receptores de interferón alfa y beta (IFN-alfa e IFN-beta), de interleucina 4 (IL-4), del factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), moléculas relacionadas con la activación y maduración de linfocitos como el receptor de linfocitos T (TCR) y moléculas como la granzima A implicada en el proceso de citotoxicidad mediada por linfocitos.

Los resultados de este trabajo permitieron diseñar mejores esquemas de tratamiento con inmunosupresores para los pacientes trasplantados, así como para predecir eventos de rechazo agudo de riñón y mejorar el esquema de tratamiento (Flechnera S, et al; 2004).

Con ayuda de los microarreglos de DNA se han podido establecer diferencias en el perfil de expresión de genes de los corazones de ratones viejos y ratones jóvenes y gracias a ese estudio se sabe que el cambio de perfil de expresión de genes en cardiomiocitos de ratones viejos tienen similitudes con los que se presentan en ciertas patologías del corazón, lo que hace que este órgano vaya perdiendo la capacidad de adaptarse al estrés, lo que finalmente desencadena fallas cardíacas (Bodyak N., et al; 2002).

En oncología los microarreglos se han usado para identificar y diagnosticar algunos tipos de cáncer que son difíciles de establecer de manera clínica y que muchas veces sólo se establecen por patología, tal es el caso de varios tipos de linfoma de linfocitos B grandes y difusos (Alizadeh, et al; 2000), lo que ha permitido que se establezcan nuevos subtipos de este linfoma, lo cual ha impactado en la supervivencia de los pacientes diagnosticados.

En otros tipos de cáncer, el perfil de expresión de genes ha permitido diseñar mejores esquemas de tratamiento y de la misma forma ha permitido hacer predicciones de la respuesta al tratamiento con quimioterapia.

En 2002 van't Veer demostró que el análisis de expresión de genes del tejido afectado por el cáncer de mama permite predecir qué pacientes desarrollarán metástasis con más precisión que con los criterios clínicos convencionales (van't Veer, et al; 2002).

También el análisis de expresión de genes permite hacer pronósticos de supervivencia de pacientes afectados con algunos tipos de cáncer como se demostró en el trabajo de Tomas Fillies, el cual demuestra que la sobreexpresión del factor de transcripción inducido por hipoxia alfa (HIF1-alfa) es un marcador que permite establecer un buen pronóstico en pacientes afectados por cáncer de boca (Fillies T, et al; 2005).

El valor predictivo del análisis del perfil de expresión de genes en cáncer ha tomado tanta importancia que se han publicado diversos trabajos en los que se propusieron reglas para clasificar diferentes tipos de cáncer en base al perfil de expresión de genes (Tan A, et al; 2005); recientemente se publicó un nuevo criterio para clasificar desde el punto de vista molecular el cáncer de mama que permite realizar pronósticos de evolución de la enfermedad (Pusztai L, et al; 2008).

Cabe señalar que el poder de predicción sobre el pronóstico de evolución de la enfermedad que se ha alcanzado con el estudio molecular del cáncer ha aumentado con el uso simultáneo de los microarreglos de tejidos y microarreglos de proteínas (Abramovitz M y Leyland-Jones B; 2006).

Las aplicaciones en el estudio clínico y farmacológico de los microarreglos en cáncer es quizá el campo más ampliamente desarrollado y cabe mencionar que también se ha empleado para estudiar otros tipos de cáncer como el colorrectal (Graudens E, et al; 2006), cáncer de mama (Nagasaki y Miki, 2006), cáncer de esófago (Hu N, et al; 2006). En linfoma de zona marginal se han identificado factores de transcripción como c-fos, c-jun, junD, entre otros (Troen G, et al; 2004).

Los microarreglos también se han empleado en el estudio de otro tipo de padecimientos, contribu-

yendo con el esclarecimiento de mecanismos inherentes a la patología, tal es el caso de la *diabetes mellitus* en la cual se ha podido entender cómo se inician y mantienen los procesos con los que el organismo se vuelve resistente a la insulina y con los datos obtenidos del análisis de microarreglos y de la PCR en tiempo real, se han logrado identificar y relacionar el papel de citocinas (IL-1 beta, IL-12, IL-6) y enzimas que modifican a los lípidos de baja densidad con la aparición de una población morfológicamente diferenciada y relacionada con la regulación de procesos inflamatorios, como es el caso de las células esponjosas (macrófagos activados), los cuales contribuyen de manera contundente mediante un proceso inmunológico a que el organismo se vuelva resistente a la acción de la insulina (Sashkin P., et al; 2006).

Así, los microarreglos constituyen actualmente una herramienta de uso más amplio en el estudio de enfermedades crónico-degenerativas, algunas con un trasfondo autoinmune como es el caso de la esclerosis múltiple, en donde se comparan los perfiles de expresión entre tejido cerebral con lesiones causadas por procesos inflamatorios agudos y el cerebro afectado por lesiones crónicas sin proceso inflamatorio y se encontró que la expresión de citocinas pro-inflamatorias es una constante en las lesiones agudas (OPN y el factor estimulante de colonias granulocíticas), mientras que genes que codifican para receptores de la región Fc de IgG predominan en las lesiones crónicas (Chabas D, et al; 2001; Lock C, et al; 2002).

Otras enfermedades en las que se han empleado los microarreglos como herramienta de estudio es el caso de la osteoporosis (Lui Y, et al; 2006); en otros modelos experimentales se han identificado nuevos blancos farmacológicos que pueden usarse en el tratamiento de la atrofia muscular espinal (Lee S, et al; 2008).

Cabe señalar que en muchos de estos estudios se combinan el uso de microarreglos de proteínas y tejidos en conjunto con los de DNA, lo cual complementa la información obtenida de la expresión de genes con las interacciones entre proteínas y la producción de antígenos en tejidos.

En términos generales de los microarreglos de proteínas podemos obtener información sobre las interacciones proteína-proteína, datos tan relevantes como los que reportó Zhu y quienes observaron nuevas proteínas capaces de interactuar con calmodulina y fosfolípidos (Zhu H, et al; 2001); en otros casos se han utilizado microarreglos con anticuerpos para analizar la producción de antígenos en tejido obtenido de biopsias de cáncer de cavidad oral (Huang R-P, et al; 2001).

PERSPECTIVAS

Si bien el primer reporte de microarreglos apareció en 1995 (Schena M., et al, 1995) y su uso se ha difundido ampliamente en diversos campos del conocimiento, todavía es una herramienta de investigación y diagnóstico que se está insertando en el panorama de recursos técnicos y científicos de muchas áreas de investigación y no está por demás decir que se encuentra en una etapa temprana de su desarrollo.

Queda mucho camino por delante en lo que se refiere al diseño y desarrollo de las diferentes plataformas; la aplicación de nuevas tecnologías de detección y la implementación y mejora de las ya existentes, ofrecen un panorama muy alentador en el desarrollo de una técnica que puede ofrecer mayor sensibilidad en lo que se refiere a los estudios a nivel de genoma.

Sin embargo, es indispensable que haya un mayor desarrollo en lo referente a las técnicas de análisis, en la integración de grupos multidisciplinarios que permitan abordar de manera más completa este tipo de estudios. Todavía queda mucho por hacer desde el punto de vista tecnológico, metodológico y en la generación de conocimientos para poder hacer un uso pleno de esta técnica, la cual puede ayudarnos a responder muchas preguntas que no se podrían responder con el análisis particular de un número muy limitado de genes de manera simultánea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Molecular Biology* 1975; 98: 503-517.
2. Napoli C, Lerman L, Sica V, Lerman A, Tajana G, de Nigris F. Microarray Analysis: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians. *Heart* 2003; 89: 597-604.
3. Xu Q, Lam K. Protein and chemical microarrays-powerful tools for proteomics. *J Biomed and Biotechnol* 2003; 5: 257-266.
4. López M, Mallorquín P, Vega M. *Tecnologías de microarreglos*. Microarrays y Biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA/CIBT-FGUAM 2002: 10-20.
5. Liu Y, Hui S, Peng X, Dong-Hai X, Li-Hua L, Recker R, Deng H. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: A 2004 Update. *J Bone Miner Res* 2004; 21: 10 1511-1535.
6. Bignell G, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, Grigorova M, Jones K, Wei W, Stratton M, Futreal A, Weber B, Shaperro M, Wooster R. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Research* 2006; 14: 287-295.
7. Volpe E, Cappelli G, Grassi M, Martino A, Serafino A, Colizzi V, Sanarico N, Mariani F. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol* 2006; 118: 449-460.
8. Fu, Li M. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis* (Edinb) 2006; 86(2): 134-143.

9. Orntoft T, Kruhøffer DNA. Chips and microarrays. *Encyclo Life Scien* 2006; 10.1038/npg.els.0005675:1-5.
10. Snijders A, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle A, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue J, Gray J, Jain A, Pinkel D, Albertson D. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; 29: 263-264.
11. Khun K, Baker S, CHudin E, Lieu M, Oeser S, Bennett H, Rigault P, Barker D, McDaniel T, Chee M. A novel high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. *Genome Research* 2004; 14: 2347-2356.
12. Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, Levy D. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 3258-3263.
13. Zhou Y, Ramachandran V, Kumar KA, Westenberg S, Refour P et al. Evidence-based annotation of the malaria parasite's genome using comparative expression profiling. *PLoS ONE* 2008; 3(2): e1570. doi:10.1371/journal.pone.0001570.
14. Liljedahl U, Fredriksson M, Dahlgren A, Syvänen A. Detecting imbalanced expression of SNP alleles by minisequencing on microarrays. *BMC Biotechnology* 2004; 4:24 doi:10.1186/1472-6750-4-24.
15. Kasukabe T, Kado J, kato N, Sassa T, Honma Y. Effects of combined treatment with rapamycin and cotylenin A, a novel differentiation-inducing agent, on human breast carcinoma MCF-7 cells and xenografts. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R1097-R1110.
16. Mantripragada K, Buckley P, Stahl T, Dumanski J. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet* 2004; 20: 87-94.
17. Flechner S, Kurianb S, Headc S, Sharpb S, Whisenantc T, Zhangd J, Chismarc J, Horvathe S, Mondalac T, Gilmartinc T, Cooka D, Kayd S, Walkerd J, Salomonb D. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *American Journal Transplant* 2004; 4(9): 1475-1489.
18. Bodyak N, Kang P, Hiromura M, Suljoadikusumo I, Horikoshi N, Khrapko K, Usheva A. Gene expression profiling of the aging mouse cardiac myocytes. *Nucleic Acids Research* 2002; 30(17): 3788-3794.
19. Alizadeh A, Eisen M, Davis R, Ma C, Lossos I, Rosenwald A, Boldrick J, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell J, Yang L, Marti G, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis D, Tibshirani R, Sherlock G, Chan W, Greiner T, Weisenburger D, Armitage J, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever M, Byrd J, Botstein D, Brown P, Staudt L. Distinct types of diffuse of large B- cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511.
20. Van't Veer L, Dai H, van de Vijver M, Witteveen A, Schreiber G, Kerkhoven R, Roberts C, Linsley P, Bernards R, Friend S. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
21. Fillies T, Werkmeister R, van Diest P, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005; 5:84 doi:10.1186/1471-2407-5-84.
22. Tan A, Naiman D, Xu L, Winslow R, Geman D. Simple decision rules for classifying human cancers from gene expression profiles. *Bioinformatics* 2005; 15: 21(20): 3896-3904.
23. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans W. Molecular classification of breast cancer: Limitations and potential. *The Oncologist* 2006; 11: 868-877.
24. Abramovitz M, Leyland-Jones B. A systems approach to clinical oncology: Focus on breast cancer. *Proteome Science* 2006; 4:5 doi:10.1186/1477-5956-4-5.
25. Graudens E, Boulanger V, Mollard C, Mariage-Samson R, Barlet X, Grémy G, Couillault C, Lajémi M, Piatier-Tonneau D, Zaborski P, Eveno E, Auffray C, Imbeaud S. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biology* 2006; 7: R19 doi:10.1186/gb-2006-7-3-r19.
26. Nagasaki K, Miki Y. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer* 2006; 13: 2-7.
27. Hu N, Wang C, Hu Y, Yang H, Kong L, Lu N, Su H, Wang QH, Goldstein A, Buetow K, Emmert-Buck M, Taylor P, Lee M. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number alteration in esophageal squamous cell carcinoma using the affymetrix genechip mapping 10 K array. *BMC Genomics* 2006; 7: 299. doi:10.1186/1471-2164-7-299.
28. Trøen G, Nygaard V, Jenssen T, Ikonoumou I, Tierens A, Matutes E, Gruszka-Westwood A, Catovsky D, Myklebost O, Lauritzen G, Hovig E, Delabie J. Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-Cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J Mol Diagn* 2004; 6(4): 297-307.
29. Shashkin P, Jain N, Miller S, Rissing B, Huo Y, Keller S, Vandenhoff G, Nadler J, McIntyre T. Insulin and glucose play a role in foam cell formation and function. *Cardiovascular Diabetology* 2006; 5: 13 doi:10.1186/1475-2840-5-13.
30. Chabas D, Baranzini S, Mitchell D, Bernard C, Rittling S, Denhardt D, Sobel R, Lock C, Karpuij M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg J, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 294: 1731-1735.
31. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli S, Oksenberg J, Raine C, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002; 8: 500-508.
32. Liu C, Calin G, Volinia S, Croce C. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nature Protocols* 2008; 3(4): 563-578.
33. Lee S, Sayin A, Grice S, Burdett H, Baban D, Van den Heuvel M. Genome-wide expression analysis of a spinal muscular atrophy model: towards discovery of new drug targets. *PLoS ONE* 2008; 3(1): e1404. doi 10.1371/journal.pone.0001404.
34. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller T, Dean R, Gerstein M, Snyder M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001; 293(5537): 2101-2105.
35. Huang R-P, Huang R, Fan Y, Lin Y. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem* 2001; 294(1): 55-62.
36. Schena M, Shalon D, Davis R, Brown P. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470.

Dirección para correspondencia:
 Edgar Alejandro Medina-Torres
 Torre de Investigación 9º Piso.
 Instituto Nacional de Pediatría.
 Insurgentes Sur Núm. 3700-C
 Colonia Insurgentes Cuicuilco
 Coyoacán, México, D.F. 04530 México
 Tel/Fax: +5255 1084 3892
 E-mail: ilhuicamina@correo.unam.mx