

Microarreglos y su impacto en la salud pública

M. en C. Jesús Hernández Romano

Adscripción:
Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

Correspondencia y Sobretiros:

M. en C. Jesús Hernández-Romano

Av. Universidad #655, Col. Sta. María Ahuacatlán, CP 62508, Cuernavaca, Morelos, México. Correo electrónico: jhernandez@correo.insp.mx Teléfono: (01 777) 3 29 3000 ext. 2886 Fax: (01 777) 3 29 30 75

Fecha de aceptación: noviembre 2005

RESUMEN	ABSTRAC
Esta revisión tiene como propósito señalar las contribuciones que la técnica de los microarreglos puede aportar al área de la salud pública. Debido a su elevado costo, difícilmente se podrá implementar esta tecnología en análisis de rutina a escala epidemiológica, sin embargo, dada la gran cantidad de información que es posible obtener, los microarreglos pueden facilitar la detección de marcadores biológicos que permitan el diagnóstico oportuno de padecimientos infecciosos o crónico-degenerativos, o bien, la identificación de nuevas moléculas blanco que permitan aplicar tratamientos más específicos. Estos marcadores podrían utilizarse después en forma masiva en estudios poblacionales o de vigilancia epidemiológica. La utilidad de esta técnica dependerá de las preguntas que se deseen responder, del adecuado diseño de las placas de hibridación, en el cual juegan un papel muy importante las características de las secuencias a "imprimir" en las placas, y del análisis estadístico de los resultados. Aplicando esta tecnología, se ha podido diferenciar entre distintos tipos de cáncer, se han detectado poliovirus vacunales divergentes causantes de enfermedad, y se han detectado grupos de genes, tanto en agentes patógenos como en células hospederas, que permiten explicar la patogénesis de algunas enfermedades.	This review has the purpose to point out the contributions that microarrays technology can offer to the public health area. Microarrays will be difficult to be implemented in routine analysis to population scale, due to their high cost. However, because of the great amount of information that it is possible to obtain, microarrays can facilitate the detection of biological markers that may allow the timely diagnosis of infectious or chronic-degenerative diseases, or the identification of new target molecules to apply more specific treatments. These new markers could then be used in massive form in population based studies or epidemic surveillance. The utility of this technique will depend on the study questions, on the appropriate design of the hybridization plates, which play a very important role in regard to the sequences characteristics to "print" in the plates, and the statistical analysis of the results. Applying this technology, it has been possible to differentiate among several cancer types, it has been possible to detect disease causing divergent vaccine poliovirus, and it has been detected both in pathogen agents and in host cells, groups of genes that mediate the pathogenesis of some illnesses.

Introducción

Uno El avance en el conocimiento científico está estrechamente asociado con los avances tecnológicos y viceversa. La técnica de los microarreglos 1 muestra cómo la integración del conocimiento proveniente de diferentes áreas como la química orgánica, la biología molecular y la robótica, resulta en la generación de una nueva tecnología que nos permite avanzar en la comprensión del funcionamiento de los sistemas biológicos. Con relación a las enfermedades infecciosas y crónico-degenerativas, la técnica de los microarreglos puede incrementar nuestra capacidad para comprender cómo responde un organismo a nivel genómico frente a un agente patógeno o frente a elementos extraños como un tumor, y cuál es el comportamiento genómico del patógeno al estar en contacto con el hospedero, en otras palabras, esta técnica nos permite observar el comportamiento de genomas completos bajo condiciones específicas 2 .

Históricamente el conocimiento detallado del funcionamiento de los organismos y de la interacción hospederopatógeno ha incrementado nuestra capacidad diagnóstica y terapéutica como consecuencia de la identificación de las moléculas involucradas. Los microarreglos nos ofrecen la posibilidad de detectar nuevas moléculas que podrían utilizarse para el diagnóstico, seguimiento o tratamiento de diversas enfermedades, tanto infecciosas como crónico-degenerativas. Esto podría tener un impacto en la salud pública al proporcionar nuevos marcadores de enfermedad que permitan identificar problemas de salud con mayor exactitud y de manera más temprana. Han transcurrido 13 años desde que los microarreglos se describieron por primera vez y desde entonces su diseño y aplicaciones se han diversificado. En este

trabajo se hablará de las oportunidades que ofrecen los microarreglos para la salud pública y de las limitaciones de la técnica.

Antecedentes

La técnica de los microarreglos se basa en la hibridación de hebras complementarias de ADN y, dependiendo del diseño, permite obtener información sobre el comportamiento transcripcional de miles de genes simultáneamente o sobre la composición genómica de los organismos en estudio. Involucra la adhesión o “impresión” de secuencias de ADN sobre un soporte sólido, las cuales son incubadas con muestras que contienen múltiples secuencias marcadas, entre las que podrían estar las secuencias complementarias a aquellas fijadas en el soporte sólido. En esta técnica se denomina “sonda” al oligonucleótido unido a una superficie sólida y el término “blanco” se aplica a la secuencia o colección de secuencias a ser analizadas.

Los antecedentes de esta técnica se remontan a finales de la década del setenta, a las bibliotecas de ADN recombinante hechas en bacterias o levaduras y almacenadas en placas tipo ELISA. Las clonas que conformaban una biblioteca se analizaban para identificar segmentos traslapados y generar así los mapas físicos de segmentos genómicos o incluso de genomas bacterianos completos. Kafatos y col. 3 introdujeron la idea original de analizar múltiples secuencias simultáneamente, aplicándolas sobre papel filtro, técnica conocida ahora como “dot blot”. Hoheisel y col. 4 propusieron la idea de usar las bibliotecas de ADN recombinante arregladas sobre papel filtro a una elevada densidad como herramientas para identificar secuencias relacionadas. Una importante innovación introducida por estos autores fue reemplazar el procedimiento manual de picar e “imprimir” clonas sobre el papel filtro, por un procedimiento robotizado. La automatización incrementó la velocidad del análisis, eliminó errores humanos, permitió analizar una muestra determinada a una mayor densidad (se pudieron “imprimir” miles de clonas) y mejoró la calidad de las placas de papel así preparadas. Otro avance importante se dio al utilizar soportes impermeables.

Si bien el papel filtro presentaba algunas ventajas como el permitir cargar grandes cantidades de ADN en una pequeña área, proporcionar una gran superficie de unión y permitir cargar la muestra en grandes volúmenes de líquido, presentaba también algunas desventajas, por ejemplo, los límites y la forma de los “spots” no eran definidos y la cantidad de ADN cargado era difícil de controlar, adicionalmente, no era posible reducir el tamaño de los “spots” más allá de cierto límite, esto sumado al hecho de que el papel se expande cuando se humedece y se deforma cuando se seca. El tener una cantidad conocida de ADN, así como “spots” de tamaño y forma definidos, es crucial para el análisis automatizado de las señales de hibridación. Con la tecnología actual, cuando se colocan sobre un soporte sólido, las moléculas de ADN forman una monocapa que satura la superficie, esto permite que la cantidad de muestra unida al soporte sea consistente entre diferentes regiones del microarreglo.

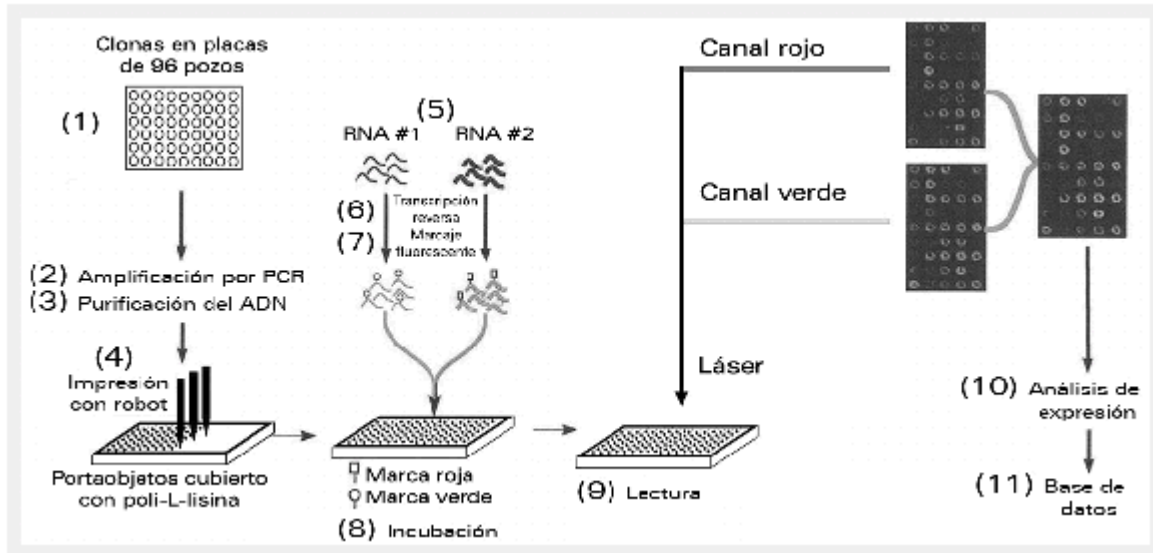
Como las sondas están sobre una superficie, la interacción con las moléculas en solución es mucho más rápida que en el papel, pues las moléculas no tienen que difundir. El proceso de lavado también mejora, pues no hay necesidad de eliminar el excedente de muestra marcada difundida, como ocurre en el papel. Además, los soportes sólidos ofrecen estabilidad dimensional y rigidez. Todos estos factores son importantes para lograr señales de hibridación confiables que permitan distinguir pequeñas diferencias entre distintas sondas del microarreglo. Los principales soportes que se han utilizado son vidrio y polipropileno, estos materiales se derivatizan químicamente para unir covalentemente las sondas de ADN, por ejemplo se pueden emplear placas de vidrio con poli-L-lisina o aminosilano 1 .

También durante los últimos 30 años hubo grandes avances en la química orgánica, impulsados por la introducción de la síntesis en fase sólida, conocimientos que se aplicaron a la biología molecular gracias al desarrollo de métodos para sintetizar ácidos nucleicos en fase sólida 5, 6 .

Gracias a estos avances actualmente es posible sintetizar por métodos automatizados polinucleótidos de cualquier secuencia y con una longitud de hasta 200 nucleótidos sobre una superficie.

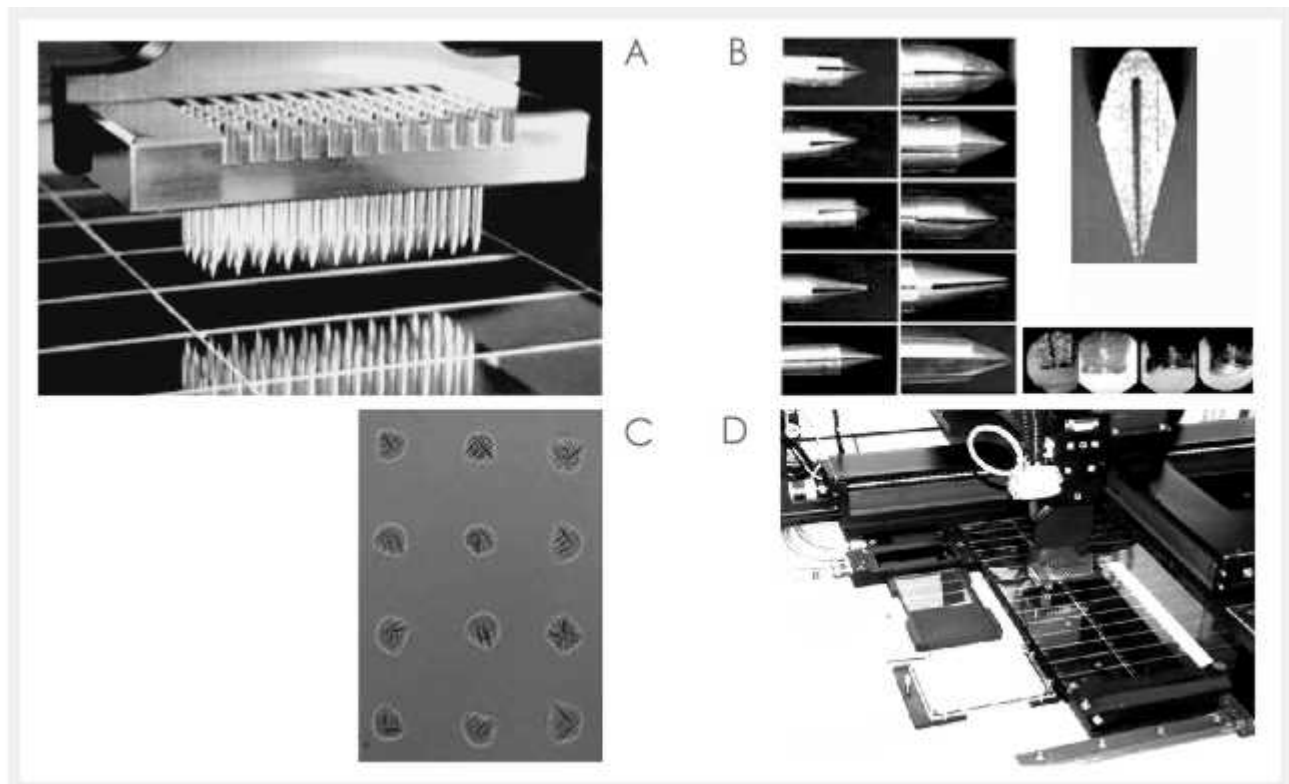
Actualmente los dos métodos más comunes para obtener una placa de microarreglos son: 1) “Spotted glass slide” y 2) “High density nucleotide array”. En el primer método (figuras 1 y 2) se utilizan secuencias de ADN pre-sintetizadas que se unen al soporte sólido y gracias a su simplicidad técnica puede fabricarse en el laboratorio de forma casera, aunque también los hay comerciales. Una desventaja es que las secuencias a “imprimir” se amplifican por PCR y no se puede saber con exactitud cuántas moléculas de ADN se cargan por “spot”. Con el segundo método, las placas se construyen sintetizando in situ oligonucleótidos cortos (de 25 a 60 mer) mediante síntesis química sobre una fase sólida 7 , de la cual existen variantes como la síntesis fotolitográfica y la síntesis basada en la química del fosforamido, estas placas sólo están disponibles comercialmente, la desventaja es que el usuario tienen que confiar en que las secuencias presentes en la placa son las que uno desea, y existen reportes de falta de concordancia entre placas comerciales que miden los mismos genes, 8, 9, 10 aunque aún está en discusión si esta falta de concordancia se debe realmente al diseño de las placas o es un reflejo de la gran diversidad de métodos estadísticos que se aplican al analizar los datos. 11, 12

Figura 1.



Análisis por microarreglos de los niveles de expresión génica utilizando la técnica de "Spotted glass slide". (1) Se parte de clones que poseen segmentos genómicos conocidos arreglados en placas que pueden ser 96 o más pozos, (2) estos segmentos genómicos se amplifican por PCR y (3) el producto se purifica para ser impreso en forma robotizada (4) sobre la superficie de un portaobjetos tratado para favorecer la unión de las moléculas de ADN. Preparada la placa, se extrae el ARN (5) de las muestras a analizar, comúnmente se comparan dos condiciones, p. ej. células infectadas vs. células sanas. Cada muestra de ARN se pasa a cDNA y se marca independientemente con compuestos fluorescentes (6 y 7), como Cy3 (verde) y Cy5 (rojo), después las muestras se mezclan y se incuban con la placa (8), se lava y se realiza la lectura (9) empleando un escáner que mide la intensidad de fluorescencia empleando el canal verde y el canal rojo. Realizada la lectura se evalúa el ruido de fondo, se eliminan los "spots" con lecturas dudosas y se determinan los niveles de expresión (10), almacenando los resultados en bases de datos (11), muchas de las cuales son bases públicas disponibles en internet (p. ej. Gene Expression Omnibus, NCBI).

Figura 2.



(A) Cabezales con puntas para depositar los "spots" sobre el portaobjetos. (B) Diferentes tipos de puntas, cada una con diferente capacidad. Se señala un tipo de punta con capacidad de 0.25 µL que puede depositar de 2 a 4 nL. Con el uso,

las puntas se deterioran, como se observa en la parte inferior, y es necesario cambiarlas. (C) “Spots ”sobre el portaobjetos, cada uno mide aproximadamente 70 micras de diámetro, y están separados por aproximadamente 150 micras. (D) Robot para depositar los “spots ”, se muestran la placa que contiene las sondas, los portaobjetos, el cabezal y la estación de lavado. [Fotografías: A y D:Cortesía de TeleChem Internacional, Inc. , ArrayIt. com, por Paul Haje. B izquierda, cortesía del Dr. Patrick Brown (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/>) . B derecha y C, cortesía del Dr. George Dimopoulos].

Dependiendo del diseño de la placa de microarreglos, se puede evaluar la presencia o ausencia de ciertas secuencias genómicas, medir la abundancia relativa de ARNm, detectar mutaciones, etc. Es importante señalar que la especificidad de la señal depende en gran parte del porcentaje de complementariedad que presenten dos hebras de ADN, y no existe una metodología estandarizada para determinar mediante un “valor de corte ”cuando una señal es positiva y cuando negativa, lo que se hace es aplicar técnicas estadísticas que permitan diferenciar una señal del ruido de fondo que presenta la placa, pero el punto de corte sigue siendo decisión del investigador.

En una placa de microarreglos, se pueden tener genomas completos, secuencias expresadas bajo ciertas condiciones (cDNA) o bien, sólo las secuencias que al investigador le interesen.

La información que proporcionan los microarreglos y su importancia para la salud pública.

El poder de una técnica depende en gran parte de la forma en la que se le utilice. El hecho de aplicar la técnica de microarreglos a un determinado problema no implica necesariamente que los resultados serán mejores comparados a los que se obtendrían aplicando una técnica más antigua y con capacidad para proporcionar menos información que los microarreglos, ello dependerá de cómo está diseñada la placa de microarreglos, de los controles positivos y negativos que se incluyan y de la interpretación de los resultados.

Un aspecto importante en salud pública es la disponibilidad de marcadores biológicos que indiquen la presencia de tal o cual afección. Si bien el costo actual de la técnica de microarreglos y sus detalles técnicos hacen imposible su implementación como una prueba de aplicación a nivel poblacional, como es usual en los estudios de salud pública, esta técnica tiene el potencial de poder identificar marcadores biológicos que se puedan asociar con la presencia y la evolución de enfermedades crónico-degenerativas, infecciosas, agudas, subagudas o crónicas. De esta manera, los microarreglos pueden tener un impacto en el campo de la salud pública no por su aplicación directa en esta área de las ciencias de la salud, sino porque la información que proporcionan podría tener una aplicación inmediata en los estudios poblacionales, aplicando técnicas más económicas como ELISA y “dot blots ”. A continuación se mencionarán algunos ejemplos de la aplicación de los microarreglos para buscar soluciones a problemas de salud pública.

Cáncer y microarreglos

Covel y col. , 13 utilizando bases de datos de microarreglos para diferentes tipos de tumores, identificaron perfiles de expresión genética característicos para cada tipo de tumor, que los diferenciaba entre sí y del tejido sano. Estos autores identificaron 1, 139 genes expresados diferencialmente entre diferentes tumores, de un total de 5, 183 genes evaluados. En base al perfil de expresión de estos genes pudieron diferenciar 14 tipos de tumores. Entre aquellos tipos de tumores que podían ser clasificados en base a su perfil de expresión se encontraban las leucemias, tumores del sistema nervioso central, melanomas, y tumores uterinos.

Sin embargo, hubo ciertos tipos de cáncer que no pudieron ser clasificados utilizando los datos de microarreglos reportados, como el cáncer colorrectal, cáncer de ovario, de seno y de pulmón. De estos resultados se derivan dos puntos importantes, primero, que el poder de la técnica de microarreglos es limitado, pues no puede distinguir cambios en ciertos tipos de cáncer. En este caso es probable que la limitación se deba al diseño de la placa de microarreglos, la cual incluía 5, 183 genes de los más de 20, 000 que posee el genoma humano. En segundo lugar, los resultados muestran que para ciertos tipos de cáncer existen genes con un comportamiento característico, muchos de ellos inexplorados en relación a su posible papel en cánceres específicos y con potencial para actuar como marcadores biológicos o como blancos para la terapia dirigida con menores efectos colaterales que los que se presentan con las terapias actuales.

Relacionado con el trabajo anterior, el reporte de Perou y col. 14 señala que el estudio de la expresión genética en muestras clínicas de tumores sólidos es complicado debido a la presencia de múltiples tipos celulares. Estos autores, al comparar por microarreglos los perfiles de expresión entre muestras clínicas de cáncer de seno y cultivos primarios de células derivadas de tumores mamarios, detectaron conjuntos de genes co-expresados en las muestras clínicas que parecen deberse a otros tipos celulares distintos a las células cancerosas, esto señala la importancia de evaluar el papel funcional de los genes expresados diferencialmente en la enfermedad en la que estén involucrados. Estos autores también pudieron clasificar a los tumores de seno en base a los niveles de expresión de dos grupos de genes, uno de ellos asociado con proliferación y otro integrado por genes regulados por interferón, los autores proponen nuevos estudios clínicos para determinar si éstos u otros conjuntos de genes pueden ser usados como indicadores del pronóstico de la enfermedad.

Como éstos, existen otros trabajos que abordan el estudio del comportamiento de la expresión genética en diferentes tipos de cáncer, si de estos estudios se logran extraer marcadores tumor-específicos asociados con diagnóstico y pronóstico de distintos tipos de cáncer y además se logran identificar moléculas blanco que permitan tratar los diferentes tumores de una manera más específica, el impacto de la técnica de microarreglos en la salud poblacional será enorme, no debido a su aplicación directa en estudios de campo, sino como consecuencia del conocimiento generado acerca del comportamiento de los genes en cánceres específicos.

Enfermedades infecciosas y microarreglos

Cherkasova y col, 15 usando placas de microarreglos caseras para el estudio de poliovirus, las cuales permitían, por un lado, evaluar la heterogeneidad en la secuencia de genes específicos del virus, y por otro, detectar eventos de recombinación, obtuvieron mapas genéticos de poliovirus aislados de personas sanas, de personas que padecieron poliomielitis y de personas que desarrollaron parálisis flácida aguda. Los resultados mostraron que los virus obtenidos de estos grupos de personas eran de origen vacunal y habían experimentado eventos de recombinación con otras cepas virales tanto vacunales como silvestres. La técnica de microarreglos identificó también regiones de acumulación de mutaciones en la secuencia codificante para la proteína de cápside VP1, reconocida por anticuerpos neutralizantes.

Estos resultados muestran la factibilidad de llevar a cabo análisis a escala genómica de aislamientos virales, utilizando la técnica de microarreglos, con fines de vigilancia epidemiológica, como control de calidad de vacunas y/o para evaluar cambios genéticos asociados con la selección viral en respuesta al tratamiento farmacológico. Un dato importante que mencionan estos autores al comparar las ventajas de su sistema casero con los sistemas comerciales, es que del 96 al 98% de las sondas producidas mediante síntesis inducida por luz (síntesis fotolitográfica, utilizada por la compañía Affymetrix, uno de los principales proveedores de placas de microarreglos comerciales) presentan secuencias diferentes de aquéllas que se pretenden obtener, lo que resulta en una baja especificidad de hibridación.

Wilson y col. 16 compararon la capacidad de tres sistemas diferentes de genotipificación para detectar mutaciones asociadas a la resistencia del HIV al tratamiento farmacológico, uno de ellos se basaba en secuenciación, otro en microarreglos y otro en hibridación tipo Southern; los resultados demostraron que los tres sistemas presentaban una capacidad similar para identificar mutaciones puntuales clínicamente importantes. Este trabajo y el de Cherkasova y col. 15, muestran cómo la técnica de microarreglos, cuando se diseña adecuadamente, puede ser capaz de detectar mutaciones puntuales a un nivel semejante al que se obtiene utilizando métodos de secuenciación.

En estos trabajos se evaluaron las características genómicas de agentes patógenos (poliovirus y HIV), en los siguientes se analiza la respuesta de las células infectadas.

Zhu y col. 17, empleando cultivos de fibroblastos humanos, utilizaron los microarreglos para evaluar los cambios en el nivel de expresión de cerca de 6, 600 genes debido a la infección por citomegalovirus. De esta manera, detectaron un conjunto de 258 genes cuya expresión cambiaba por un factor de 4 o mayor frente a la infección por citomegalovirus.

Según los autores, varios de estos genes podrían participar en la patogénesis viral.

Eckmann y col., 18 utilizando cultivos de células epiteliales intestinales humanas infectadas con Salmonella, evaluaron los cambios en la expresión de aproximadamente 4, 300 genes, identificando un grupo de 30 genes cuyo nivel de expresión se incrementaba entre 2. 10 y 4. 41 veces con respecto al control sin infectar. Estos resultados amplían el conocimiento sobre la respuesta de las células epiteliales a una infección por un patógeno entérico invasivo, un prerrequisito importante para el desarrollo racional de estrategias de tratamiento o de vacunación.

En el caso de Bordetella pertussis, agente causal de la tosferina, si bien se conocen varios factores de virulencia, no está claro cómo la interacción de la bacteria con las células hospederas conduce al desarrollo de una enfermedad. Belcher y col. 19 utilizando una línea celular de epitelio bronquial, evaluaron los cambios en los niveles de expresión de aproximadamente 6, 800 genes humanos frente a la infección por B. pertussis, identificando un grupo de 33 genes cuya expresión se incrementaba al menos 3 veces con respecto a las células control sin infectar. Entre los genes de las células epiteliales inducidos por la presencia de la bacteria se encontraba el de la mucina, típicamente una barrera de defensa pero que en el caso de esta bacteria es utilizada como sustrato de adhesión. Otros genes inducidos fueron los de varias citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 e IL-8, hallazgo consistente con el infiltrado celular visto en los pacientes con tosferina. Ninguna de estas moléculas había sido previamente implicada en la infección por B. pertussis. Adicionalmente, se observó que la actividad de ADP-ribosiltransferasa de la toxina de B. pertussis afectó la expresión de un grupo selecto de genes celulares, tanto positiva como negativamente, señalando posibles vías que conducen al desarrollo de la enfermedad.

De este tipo de trabajos se pueden extraer conclusiones semejantes a las que se obtiene al evaluar el perfil de expresión de varios genes en los diferentes tipos de cáncer, aplicando ahora la técnica de microarreglos al estudio de la interacción hospedero-patógeno. La ventaja que ofrece este abordaje metodológico es que permite observar el comportamiento de un gran número de genes frente a un organismo infeccioso en particular y en uno o varios puntos en el tiempo, siendo esta una forma de evaluar, a nivel molecular, cómo "ve" el hospedero al patógeno. 20 Es importante hacer notar que en los trabajos mencionados se utilizaron siempre líneas celulares cultivadas in vitro, por lo que es posible que la respuesta

de expresión obtenida no refleje fielmente lo que ocurre in vivo frente a una infección por el patógeno correspondiente, en donde el microambiente que rodea a una célula o tejido en un momento dado puede modificar su respuesta frente a la infección.

De manera semejante a cómo se evalúan los cambios en los niveles de expresión genética de los genes, se puede evaluar también la diferencia a nivel genómico entre especies o entre clones de una misma especie determinando la presencia o ausencia de secuencias genéticas. Kato-Maeda y col. 21 usaron los microarreglos para estudiar la variabilidad genética dentro de 19 clones de *Mycobacterium tuberculosis* caracterizadas clínicamente y epidemiológicamente, buscando una asociación con su evolución y patogénesis. Empleando una placa que contenía no solo secuencias codificantes, sino también regiones intergénicas, encontraron delecciones genómicas que eran diferentes para cada clona, conforme la cantidad de delecciones se incrementaba, se reducía la capacidad de la bacteria para causar cavitaciones pulmonares, lo que sugería que la acumulación de mutaciones tendía a disminuir su patogenicidad. Se estima que para el final del 2010 se tendrán 80 millones de casos de tuberculosis, muchos de ellos drogo-resistentes. La vacuna actual contra este padecimiento se desarrolló originalmente por Calmette y Guérin, quienes pasaron una cepa de *Mycobacterium bovis* 230 veces in vitro entre 1908 y 1912. Debido a que no se pueden preservar bacterias viables por congelación, esta cepa vacunal ha requerido de pases continuos, lo que ha resultado en una abundancia de cepas hijas fenotípicamente diferentes, colectivamente conocidas como BCG. Behr

y col. 22 realizando experimentos de hibridación comparativa con placas de microarreglos, evaluaron las diferencias genómicas entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y varias cepas hijas BCG, encontrando regiones exclusivas de *M. tuberculosis* y regiones presentes en *M. bovis* pero ausentes en algunas o todas las cepas BCG, demostrando su evolución desde su derivación original. El conocimiento detallado de las diferencias genéticas entre este grupo de micobacterias estrechamente relacionadas podría ser utilizado para diseñar mejores vacunas, pues se asume que ciertas presiones para minimizar los efectos adversos de la vacunación y mantener la reactividad a la tuberculina podrían resultar en vacunas impotentes. Adicionalmente, este conocimiento podría permitir el desarrollo de pruebas diagnósticas que permitieran diferenciar entre tuberculosis latente e inmunización por BCG.

Los trabajos anteriores muestran cómo la técnica de microarreglos puede hacer contribuciones al área de la salud pública, no como una herramienta con aplicación masiva debido al elevado costo actual de la misma, sino como una herramienta que nos permite obtener información para ser utilizada en salud pública, a través de la detección de marcadores biológicos que nos permitan diagnosticar enfermedades o que nos permitan predecir la evolución de una enfermedad. El grado de utilidad de esta técnica dependerá del adecuado diseño de la misma, puesto que no existe una regla general para preparar una placa de microarreglos, sino que su diseño puede variar dependiendo de la información que se desee obtener. Se debe tener mucho cuidado al momento de determinar cuándo una señal será considerada positiva y cuándo negativa, puesto que tampoco existen metodologías estandarizadas para obtener un punto de corte, por lo que es necesario introducir los controles adecuados y asegurarse que se tiene un proceso reproducible bajo condiciones sistematizadas de trabajo.

Otro punto importante a tomar en cuenta es que la tecnología de los microarreglos es un campo en constante cambio, por lo que se debe tener cuidado si se piensa invertir en este tipo de tecnología. Una de las fases más costosas y que mayor tiempo consumen es la obtención de clones, amplificación y purificación de las sondas y la impresión de las mismas en los portaobjetos, por lo tanto, además de invertir en equipo costoso que probablemente quede obsoleto en poco tiempo, se tendrá que invertir mucho tiempo y dinero en preparar cada tipo de placa. Actualmente existen compañías que le pueden crear al cliente el microarreglo que desee e incluso correrlo ellos mismos, todo esto en unos pocos días.

Bibliografía

1. Southern EM. DNA Microarrays History and Overview, Capítulo 1 en "DNA Microarrays ";Rampal JB editor;Humana Press, New Jersey, 2001:9-15.
2. Ferea TL, Brown PO. Observing the living genome. Curr. Op. Gen. Dev. 1999;9:715-722.
3. Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequences homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucleic Acids Res. 1979;7:1541-1552.
4. Hoheisel JD, Ross MT, Zehetner G, Lehrach H. Relational genome analysis using reference libraries and hybridization fingerprinting. J. Biotechnol. 1994;35:121-134.
5. Letsinger RL, Finnan JL, Heavner WB, Lunsford WB. Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links. J. Amer. Chem. Soc. 1975;97:3278-3279.
6. Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites –a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Letters 1981;22:1859-1862.
7. Kato-Maeda M, Gao Q, Small PM. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. Cell. Microbiol. 2001;3:713-719.

8. Tan PK, Downey TJ, Spitznagel EL, Xu P, Fu D, Dimitrov VS, et al. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:5676-5684.
9. Yauk CL, Berndt ML, Williams A, Douglas GR. Comprehensive comparison of six microarray technologies. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e124.
10. Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, et al. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. 2005; *Nat. Methods.* 2:345-349.
11. Larkin JE, Frank, BC, Gavras H, Sultana R, Quackenbush J. Independence and reproducibility across microarray platforms. 2005; *Nat. Methods.* 2:337-343.
12. Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, et al; Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. 2005; *Nat. Methods.* 2:351-356.
13. Covell DG, Wallqvist A, Rabow AA, Thanki A. Molecular classification of cancer:unsupervised self-organizing map analysis of gene expression microarray data. *Mol. Cancer Therapeutics* 2003;2:317-332.
14. Perou CM, Jeffrey SS, De Rijn MV, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. 1999; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9212-9217.
15. Cherkasova E, Laassri M, Chizhikov V, Korotkova E, Dragunsky E, Agol VI, Chumakov K. Microarray analysis of evolution of RNA viruses:evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. 2003; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:9398-9403.
16. Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems:the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. 2000; *J. Clin. Microbiol.* 38:3022-3028.
17. Zhu H, Cong J, Mamtara G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus:global monitoring with oligonucleotide arrays; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:14470-14475.
18. Eckmann L, Smith JR, Housley MP, Dwinell MB, Kagnoff MF. Analysis of high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria *Salmonella*. 2000; *J. Biol. Chem.* 275:14084-14094.
19. Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, Gingeras TR, Mcnamara N, Lemjabbar H, Basbaum C, Relman DA. The transcriptional response of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. 2000; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:13847-13852.
20. Mager ID, Relman DA. How the host "sees "pathogens:global gene expression responses to infection. 2000; *Curr. Op. Immunol.* 12:215-218.
21. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon Hugh, Drenkow J, Smittipat N, Small P; Comparing genomes within species *Mycobacterium tuberculosis*; *Genome Res.* 11:547-554, 2001.
22. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM; Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray; *Science* 284:1520-1523, 1999.