

El salto de la doble hélice. Consecuencias del Proyecto Genoma Humano en la medicina del siglo XXI (Segunda Parte)

Dr. *Barbieri Pedro
Dra. **Moya Graciela

"...en un sentido estricto, la evolución de la vida, tal como la conocemos, es la evolución de las estructuras macromoleculares..."¹

Comentario de los autores: en el texto se encuentran palabras resaltadas entre paréntesis (), lo que indica que es una abreviatura o resume una frase; otras están entre corchetes [], cuyo significado se encuentra en el diccionario; finalmente hay términos entre llaves {}, que son referencias en lengua inglesa más común de palabras que aparecen en el texto.

RESUMEN: El Proyecto Genoma Humano, iniciado en octubre de 1990, ha permitido desentrañar, 12 años después, la secuencia nucleotídica del ADN humano. Este hecho ha producido un avance singular en la medicina moderna, posibilitando, a través de la detección de las variaciones nucleotídicas en la secuencia del ADN, el desarrollo de estudios genéticos, la determinación de pronósticos y guías terapéuticas con fármacos, y el desarrollo de nuevas drogas gracias al avance de la farmacogenómica. Todo esto permitiría, en un futuro cercano, la predicción de respuestas a maniobras terapéuticas en los procedimientos de anestesia, cuidados críticos y tratamiento del dolor. Este desarrollo introduce también problemas éticos, específicamente en los campos de la terapia génica y la clonación.

The leap of the double helix. Consequences of the Human Genome Project in medicine of the 21st Century.

ABSTRACT: The Human Genome Project, begun in October 1990, has permitted, 12 years later, revelation of the sequence of human DNA. This fact has produced a singular advance in modern medicine allowing, through the genetic scrutiny of DNA variations, the development of genetic testing, prognostic and therapeutics guides with drugs and the development of new drugs with pharmacogenomic advances. All this will give us the possibility of predicting, in the near future, responses to therapeutic maneuvers in anesthesia, critical care and pain management. This development also introduces ethic problems, specifically in gene therapy and cloning.

O salto da dupla hélice. Conseqüências do Projeto Genoma Humano na medicina do século XXI.

RESUMO: O Projeto Genoma Humano, iniciado em outubro de 1990, permitiu desentranhar, 12 anos depois, a seqüência nucleotídica do ADN humano. Este

Palabras Clave

- ▶ Proyecto genoma humano
- ▶ Polimorfismos de un solo nucleótido
- ▶ Pruebas genéticas
- ▶ Farmacogenómica
- ▶ Anestesia
- ▶ Cuidados críticos
- ▶ Terapia génica
- ▶ Clonación
- ▶ Ética

Key words

- ▶ Human Genome Project
- ▶ Polymorphisms
- ▶ Genetic testing
- ▶ Pharmacogenomics
- ▶ Anesthesia
- ▶ Critical care
- ▶ Gene therapy
- ▶ Cloning
- ▶ Ethics

*Servicio de Anestesiología. Hospital Británico de Buenos Aires.

**Instituto Genos. Buenos Aires.

fato representa um importante avanço na medicina moderna que possibilita –mediante a detecção das variações nucleotídicas na seqüência do ADN– o desenvolvimento de estudos genéticos, a determinação de prognósticos e guias terapêuticas com fármacos, e o desenvolvimento de novas drogas graças aos progressos da farmacogenômica. Tudo isso permitiría, em breve, prever respostas a manobras terapêuticas nos procedimentos de anestesia, cuidados críticos e tratamento da dor. Este desenvolvimento introduz também problemas éticos, específicamente nos campos da terapia gênica e da clonación.

Palavras-chave

- ▶ Projeto genoma humano
- ▶ Polimorfismos de um único nucleótido
- ▶ Provas genéticas
- ▶ Farmacogenômica
- ▶ Anestesia
- ▶ Cuidados críticos
- ▶ Terapia gênica
- ▶ Clonación
- ▶ Ética

Introducción histórica

“...la motivación más importante fue la de comprender...”

Francis Crick

La segunda mitad del siglo XX ha sido un período sumamente fructífero en la producción de conocimientos en todas las áreas de las ciencias, mostrando un avance sin precedentes en el descubrimiento de los mecanismos íntimos del funcionamiento de la maquinaria celular, de la mano de las nuevas biotecnologías. Apenas 50 años después de que el biólogo James D. Watson² y el físico Francis Crick³ –de 24 y 37 años respectivamente, el último fallecido el 28 de Julio de 2004, en California, EE.UU.– publicaran el primer trabajo sobre la estructura doble hélice de nuestro [ácido desoxirribonucleico] (ADN)⁴, un nuevo anuncio revolucionaría el campo de la biología el 14 de abril de 2003: luego de aproximadamente 12 años de trabajo, el esfuerzo internacional iniciado en octubre de 1990 para desentrañar los misterios de la doble hélice había llegado a establecer la secuencia completa del genoma humano^{5,6} (disponible en <http://www.genome.gov/11006929/>), “Bienvenidos a la Era Genómica”, editorial de Alan Guttmacher y Francis Collins⁸, finalizando una serie de publicaciones comenzada en noviembre de 2002 sobre Medicina Genómica. Allí establecen claramente que “... si bien se puede dar fecha de nacimiento a dicha era como el día de la publicación de la secuencia completa, no se pueden sacar más conclusiones que las que se plantean al ver a un recién nacido, sin conocer que tipo de adulto será ...”

Sin embargo, la [genómica] ya ha comenzado a cambiar nuestra forma de abordar la medicina, brindando avances inimaginables hasta hace pocos meses, por ejemplo:

- La identificación de nuevos agentes patógenos, como el involucrado en el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)^{9,10}.
- La confirmación del diagnóstico clínico de enfermedades, por ej.: ataxias espinocerebelosas, síndromes genéticos.
- La generación de vacunas a virus altamente patogénicos atenuados, como el de la influenza, mediante [genética reversa]^{11,12}.

- La evaluación de perfiles de expresión génica para establecer pronóstico y predecir respuesta al tratamiento, como en casos de cáncer de mama¹³.
- La predicción del riesgo de padecer enfermedades, como en la Corea de Huntington, el síndrome del QT prolongado¹⁴ o el infarto de miocardio¹⁵.
- El conocimiento acerca de las respuestas a drogas, como los antiepilépticos¹⁶.
- El diseño e implementación de nuevas terapias génicas o con drogas convencionales¹⁷.
- La contribución de genes específicos en condiciones frecuentes, como la obesidad¹⁸.

El conocimiento producido por el estudio genómico ha develado la estructura de los cromosomas 6, 7, 13, 14, 19 (con 1500 genes en su estructura), 20, 21, 22, y el cromosoma Y (responsable de las características sexuales masculinas)¹⁹⁻²¹, lo cual podría ayudar a definir más claramente la interacción entre el genoma y el ambiente, estableciendo qué características humanas son innatas o adquiridas. El estudio de la variación de la información genética en amplios grupos de pacientes permitiría definir la contribución del [genoma] y del [ambiente] no solo en enfermedades importantes, sino también en la respuesta a fármacos^{22, 23}. También se podrían responder las incógnitas referidas a las funciones complejas de la condición humana, como el lenguaje, el pensamiento, la conciencia y otras funciones mentales superiores²⁴.

Otros van más allá, refiriéndose a una “era posgenómica” no muy lejana, con “...un futuro ilimitado para la proteómica...”^{25, 26}, a través del estudio de los mecanismos regulatorios de la expresión génica, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas en el tiempo y en los distintos tejidos. Las implicancias de estos descubrimientos son fundamentales para la investigación y el desarrollo (R&D) {Research & Development} de drogas más seguras y eficaces para cada individuo en la población²⁷, mediante el desarrollo de la farmacogenómica²⁸.

Todo esto ha impulsado la investigación y desarrollo en miles de empresas en todo el mundo. Se trabaja aproximadamente en 25.000 áreas diferentes de ingeniería genética, en más de 60 plantas en 45 países. Sólo en EE.UU. se realizaron modificaciones genéticas en 6.500 organismos en

18.000 sitios diferentes. Este desarrollo hace necesario el manejo de un nuevo arsenal de términos y conocimientos en el quehacer médico cotidiano, incluyendo a la anestesia, los cuidados críticos y el tratamiento del dolor.

Los ácidos nucleicos

Desde fines del 1600, cuando Anthony van Leeuwenhoek pulía sus lentes de más de 300 X para observar bacterias "...mezcladas con clara agua de lluvia..."²⁹, el estudio de los diferentes componentes celulares despertó interés en el mundo científico³⁰. El núcleo celular, con sus [cromosomas], comenzó a verse durante la [metafase] mitótica coloreado como condensaciones cromáticas [cromatina] (Figura 1). Cada cromosoma eucariótico está constituido por una única molécula de ADN doble cadena lineal, asociada a proteínas básicas [(histonas)] que estabilizan la doble hélice. Cada cromosoma presenta un brazo corto (p) y un brazo largo (q) unidos por el centrómero. El mapeo cromosómico se establece sobre un número creciente de bandas a partir del centrómero hacia los extremos, nomenciándose un determinado [locus] con el número y brazo de cromosoma, el número de banda y el número de sub-banda [alelo]; por ejemplo, para el gen que codifica para el receptor rianodina del músculo esquelético –RYR1–, la designación 19q13*1 (cromosoma 19, brazo largo, región 1, banda 3, sub-banda 1), existiendo más de 30 mutaciones conocidas de este gen (Figura 2).

El Dogma Central de la Biología establece que la información genética codificada en el ADN se copia [(transcripción)] en un ARN mensajero, que se traducirá en el citoplasma [(traducción)] en una proteína, gracias a la "maquinaria proteosintética ribosomal" (Figura 3).

Tanto el ADN como el ARN [ácidos nucleicos] presentan semejanzas estructurales. Por su estructura primaria, ambos son [polímeros] lineales compuestos por [monómeros] llamados [nucleótidos]. La molécula de ARN puede tener de cien a varios miles de nucleótidos, mientras que las moléculas de ADN pueden estar constituidas por varios cientos de millones de nucleótidos³¹. Ambos se componen de sólo cuatro nucleótidos diferentes, todos con una estructura común: una base orgánica (adenina, timina, citosina, guanina) que a su vez se une a un grupo fosfato unido a una pentosa (molécula de azúcar de 5 carbonos). En el ARN el azúcar es la ribosa, y en el ADN la desoxirribosa. Las bases adenina, guanina y citosina se encuentran en el ADN y el ARN, la timina en el ADN y el uracilo en el ARN (Figura 4). El fosfato (ácido) atrae proteínas histonas (básicas). Una base con un azúcar forman un nucleósido (sin fosfato). Cuando se asocian con 1, 2 o 3 fosfatos esterificados en el carbono 5' se habla de nucleótidos (Figura 5). Los trifosfatos de nucleósido se utilizan para sintetizar ácidos nucleicos, aunque también participan en otras funciones celulares (el ATP es el portador de energía más utilizado por la célula, y el

GTP interviene en la señalización intracelular y actúa como reservorio de energía), sobre todo en la síntesis proteica.

La secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster constituye la estructura primaria de los ácidos nucleicos. Éstos, además, se pliegan para adoptar conformaciones tridimensionales estabilizadas por enlaces no covalentes – estructura secundaria (enrollamiento de la doble hélice del ADN) y terciaria, [superenrollamiento] (Figura 2).

El ARN puede ser:

- mensajero (ARNm) (existe un mensajero para cada tipo especial de proteína),
- de transferencia (ARNt) (liga tripletes de nucleótidos estrictamente como el ARN mensajero lo ha copiado del ADN),
- ribosomal (ARNr).

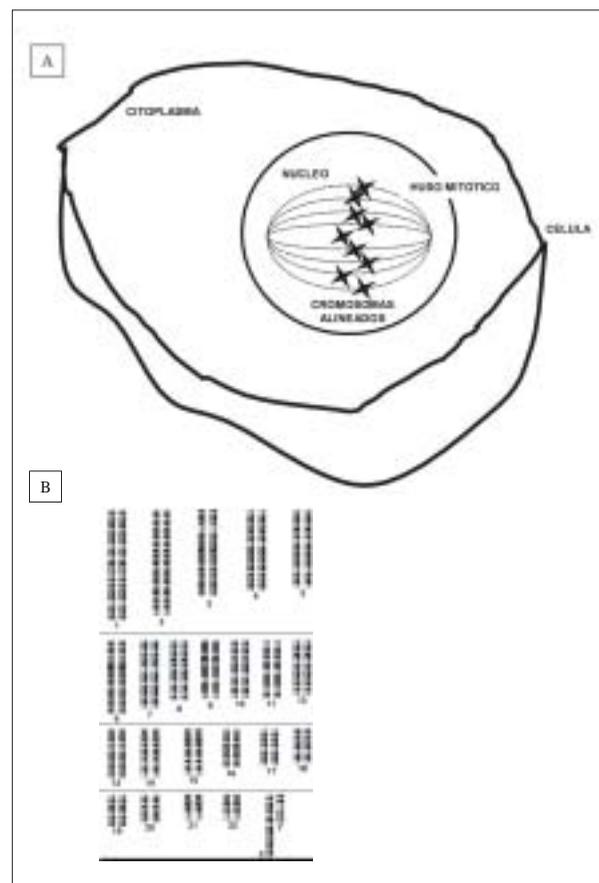


Fig. 1: Corte esquemático de una célula con su núcleo en metafase mitótica. A) Vista de los cromosomas alineados sobre el huso mitótico, paso previo a la división celular. B) [cariotipo] normal humano (bandeo), con sus 23 pares de cromosomas. (modificado de www.genaissance.com/pharmacogenomics/glossary).

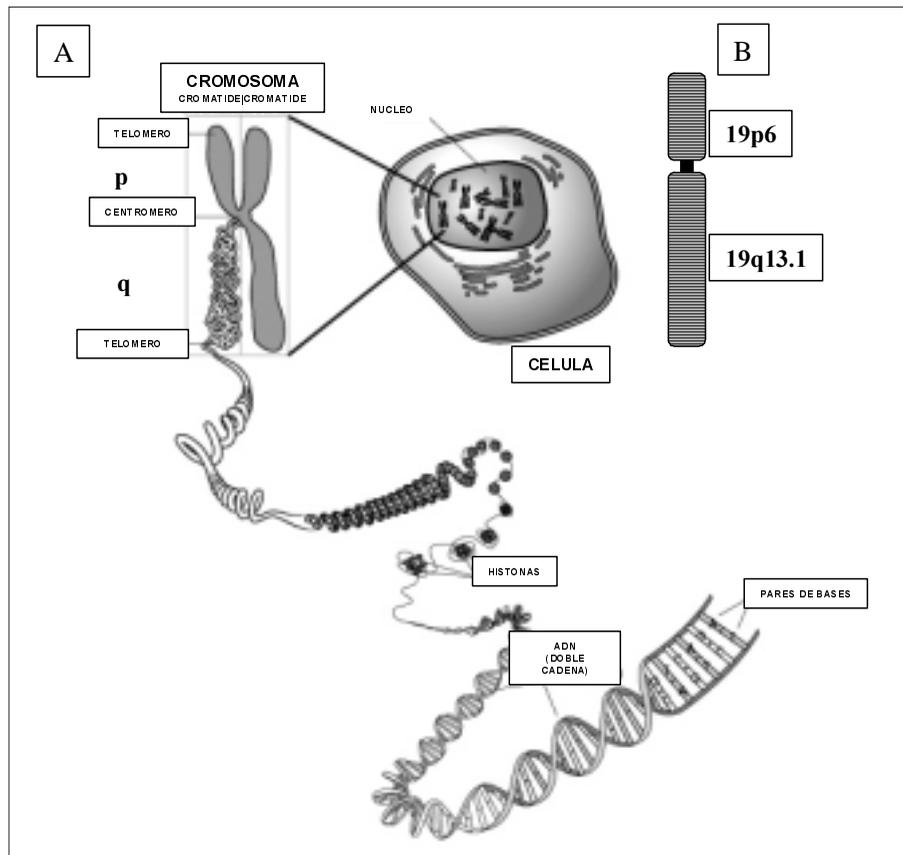


Fig. 2: A) Estructura de los ácidos nucleicos, y constitución cromosómica. B) Nomenclatura empleada para definir un determinado locus en un cromosoma (el primer número indica el número de cromosoma; la letra el brazo -p: corto; q: largo-; el segundo número indica el locus, identificado desde el centrómero al extremo. Las bandas características de los sitios se tiñen con reactivo de Giemsa, luego de un breve tratamiento proteolítico. (modificado de www.genaissance.com/pharmacogenomics/glossary)

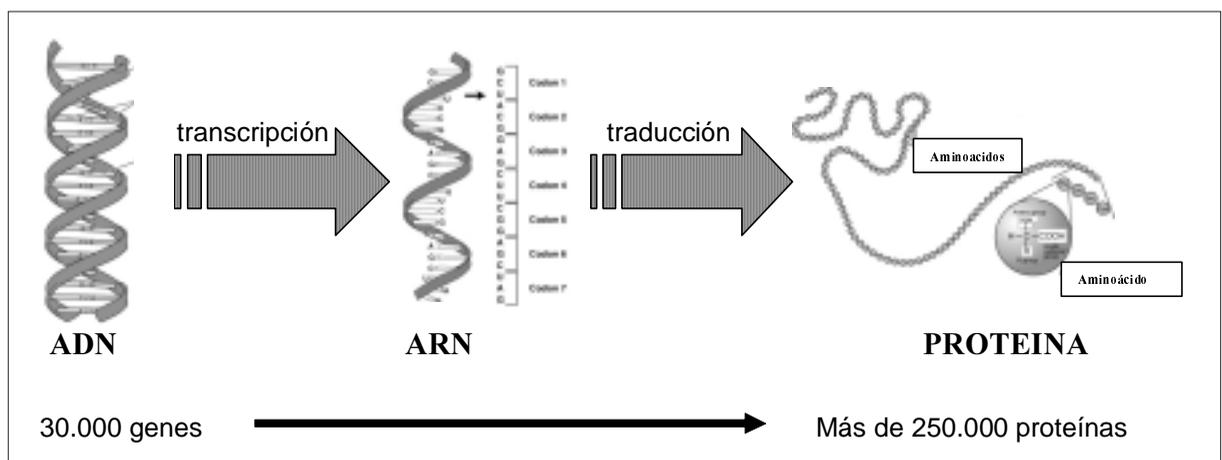


Fig. 3: Dogma central de la biología (la información genética codificada en el ADN se copia en un ARN mensajero que se traducirá finalmente en proteínas en el citoplasma).

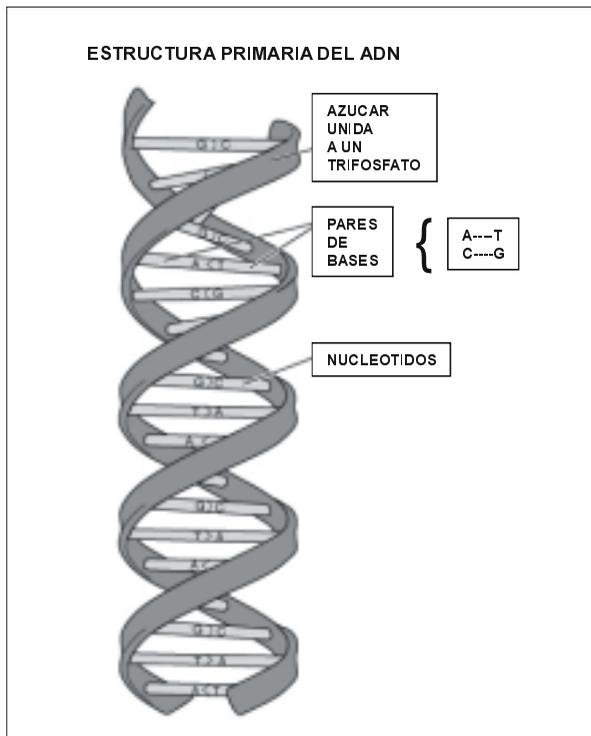


Fig. 4: estructura primaria del ADN y componentes.

El ADN, el ARN y las proteínas están presentes en todas las células nucleadas del organismo.

Replicación del ADN bicatenario (duplex)

Ciclo celular: suma de las fases de crecimiento de una célula eucarionte. Incluye las fases G1, S (replicación del ADN), G2 y M (mitosis).

Durante la fase S del ciclo celular, las hebras del ADN progenitoras (molde, patrón o plantilla) se copian para formar dos nuevas hebras hijas (Figura 6). Debido a que el ADN duplex está formado por dos hebras entrelazadas, el copiado de pares de bases de cada hebra requiere desenrollar el duplex original por medio de "proteínas desenrolladoras específicas" [helicosas]. El desenrollado local del ADN produce estrés de torsión, que lleva a la formación de [superenrollamientos], los que son eliminados por [topoisomerasas]. La acción de todas estas enzimas proteicas produce una región móvil muy especializada del ADN llamada horquilla de crecimiento, en donde la [ADN polimerasa] (ADN pol) agrega nucleótidos. Para que la ADN polimerasa se pueda desplazar y copiar un ADN duplex, la helicasa debe desenrollar el duplex en secuencia, y la topoisomerasa eliminar los superenrollamientos que se forman. Luego, una ARN polimerasa especializada forma cortos iniciadores de

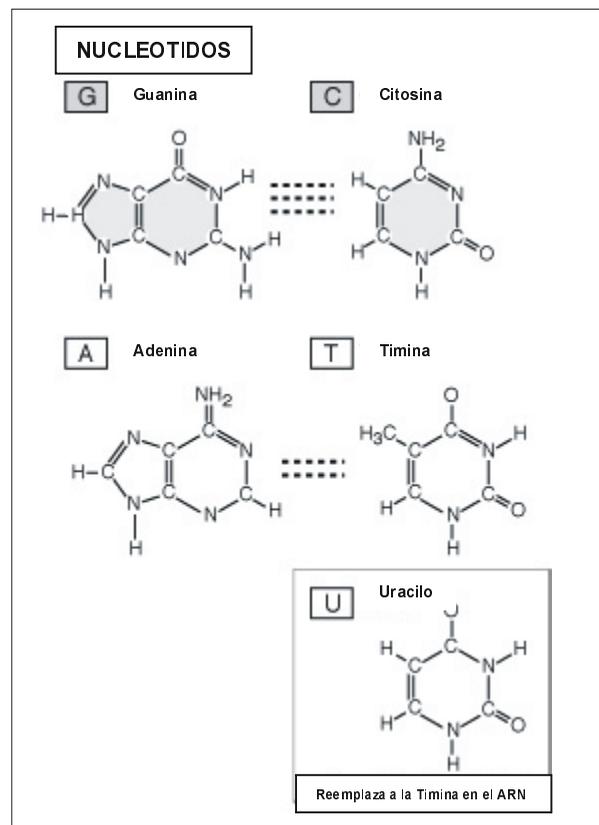


Fig. 5: Nucleótidos constitutivos del ADN y ARN (adenina, guanina y citosina se encuentran en el ADN y ARN; timina en el ADN, y uracilo en el ARN).

ARN complementarios a las hebras patrón desenrolladas (las ADN pol no pueden iniciar la síntesis de la cadena *de novo*: requieren de una corta hebra de ADN o ARN denominada [iniciador] {(primer)} para comenzar el crecimiento de la cadena). Una vez que el iniciador se apareó a la hebra patrón, una ADN pol agrega nucleótidos al grupo hidroxilo libre del extremo 3' del iniciador, elongando la nueva hebra hija en sentido 5' → 3'. Una de las nuevas cadenas (hebra guía) crece a partir de un único ARN iniciador en la misma dirección que la horquilla de crecimiento, mientras que la otra hebra hija (hebra retrasada) también crece en dirección 5' → 3', pero opuesta al movimiento de la horquilla de crecimiento, gracias a la producción de cortos ARN iniciadores, cada 1000 bases aproximadamente, sobre la hebra progenitora, a medida que la hebra queda expuesta. Cada uno de estos iniciadores, apareados por sus bases a la hebra patrón, se elonga en dirección 5' → 3', formando cortos segmentos discontinuos denominados [fragmentos de Okazaki]. El ARN iniciador que dio origen a cada fragmento de Okazaki es eliminado y reemplazado por la cadena de ADN en crecimiento proveniente del segmento pre-

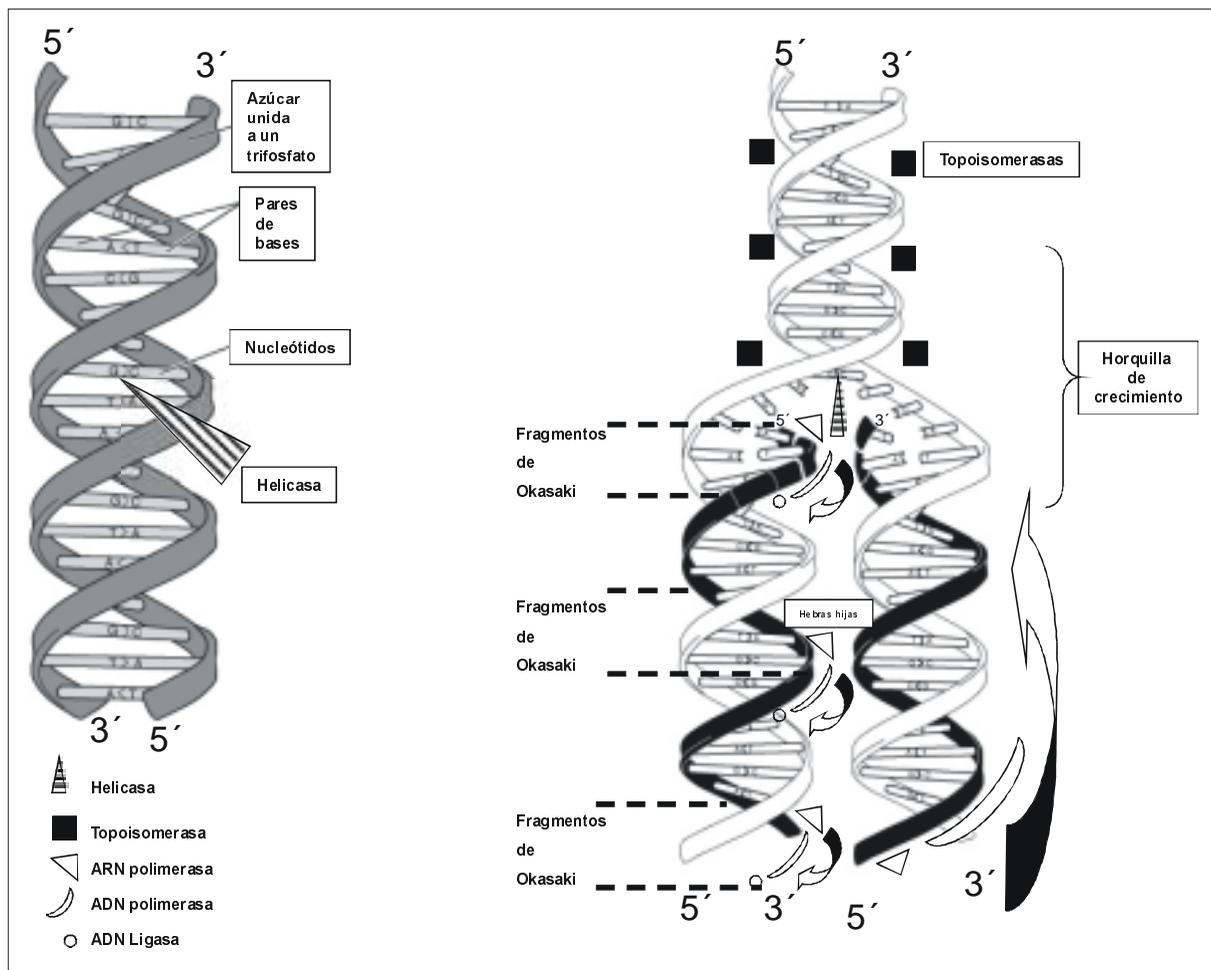


Fig. 6: Duplicación del ADN (ver el texto para explicación).

vio, y una ADN ligasa une los segmentos adyacentes. La replicación del ADN es semiconservativa, de forma que cada una de las células hijas recibe una hebra de nueva síntesis y su complementaria antigua, que ha servido de molde para generar la nueva.

El gen

"...somos máquinas supervivientes, vehículos robot programados a ciegas para proteger las moléculas egoístas conocidas como genes. Esta es una verdad que todavía me llena de asombro..."

Richard Dawkins

Un [gen] es la unidad física, funcional y fundamental de la herencia. Si bien el [fenotipo] de un individuo es la suma

de su genoma más la influencia del ambiente, los genes poseen la información heredable que determina las características físicas y psicológicas de un individuo. Una definición molecular indica que un gen es la secuencia completa de ácidos nucleicos necesaria para la síntesis de un polipéptido funcional³². Esto involucra a los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de una proteína (región codificante), además de todas las secuencias de ADN requeridas para la transcripción particular de ARN (la región regulatoria típicamente se encuentra en el extremo 5' del marco de lectura, la cual incluye la secuencia nucleotídica requerida para el control transcripcional de la expresión génica, incluso tipo celular y tejido específico, y las respuestas regulatorias a señales intra o intercelulares). La región regulatoria finaliza donde la ARN polimerasa inicia la transcripción (posición 1 del gen, Figura 3). Si bien la mayoría de los genes se transcriben a ARN mensajero que codifica proteínas, hay secuencias de ADN que se transcriben a ARN

no codificante de proteínas (ej: ARN de transferencia y ARN ribosomal), pero igualmente se llaman genes que codifican para ARNt y ARNr. También existen pequeñas cadenas de ARN (microARN) que "revolotean" sobre el genoma proviendo una matriz de control regulatorio, supervisando la actividad de genes específicos a través de la unión al ARNm y previniendo su traducción a proteínas³³ (fenómeno de la interferencia del ARN). Se cree que este mecanismo de silenciamiento de genes sería una defensa natural contra virus invasores, camino que se está explorando en la búsqueda de nuevos agentes antivirales y en terapia génica para el silenciamiento de genes defectuosos.

Síntesis de proteínas

En células eucariontes (a diferencia de las procariontes, que presentan el [operón] que reúne todas las secciones codificantes), los genes están físicamente separados en el

ADN, a veces incluso localizados sobre cromosomas diferentes. Cada gen se transcribe a partir de su propio sitio de iniciación y produce un ARNm que por lo general es traducido en una única proteína (Figura 7). La secuencia continua (ininterrumpida) de un ARNm que codifica para una proteína es discontinua (partida) en el ADN del cual se copió. El gen eucarionte presenta en el promotor una secuencia ([caja TATA]) donde se ensambla el complejo de transcripción e iniciación. El marco de lectura está constituido por porciones de la secuencia que son codificantes, los [exones], que se encuentran separados por segmentos no codificantes, los [intrones]. El producto de la transcripción de estos componentes se denomina [transcrito primario], que durante el [procesamiento del ARNm] recibe el casquete 5' (para evitar la degradación enzimática) y la cola de poliAAA en 3'; pierde los intrones, y se empalman los exones [ensamblaje del ARN] {splicing} para formar el ARNm funcional [transcrito maduro]³⁴, que finalmente será transportado al citoplasma para comenzar su traducción a proteínas.

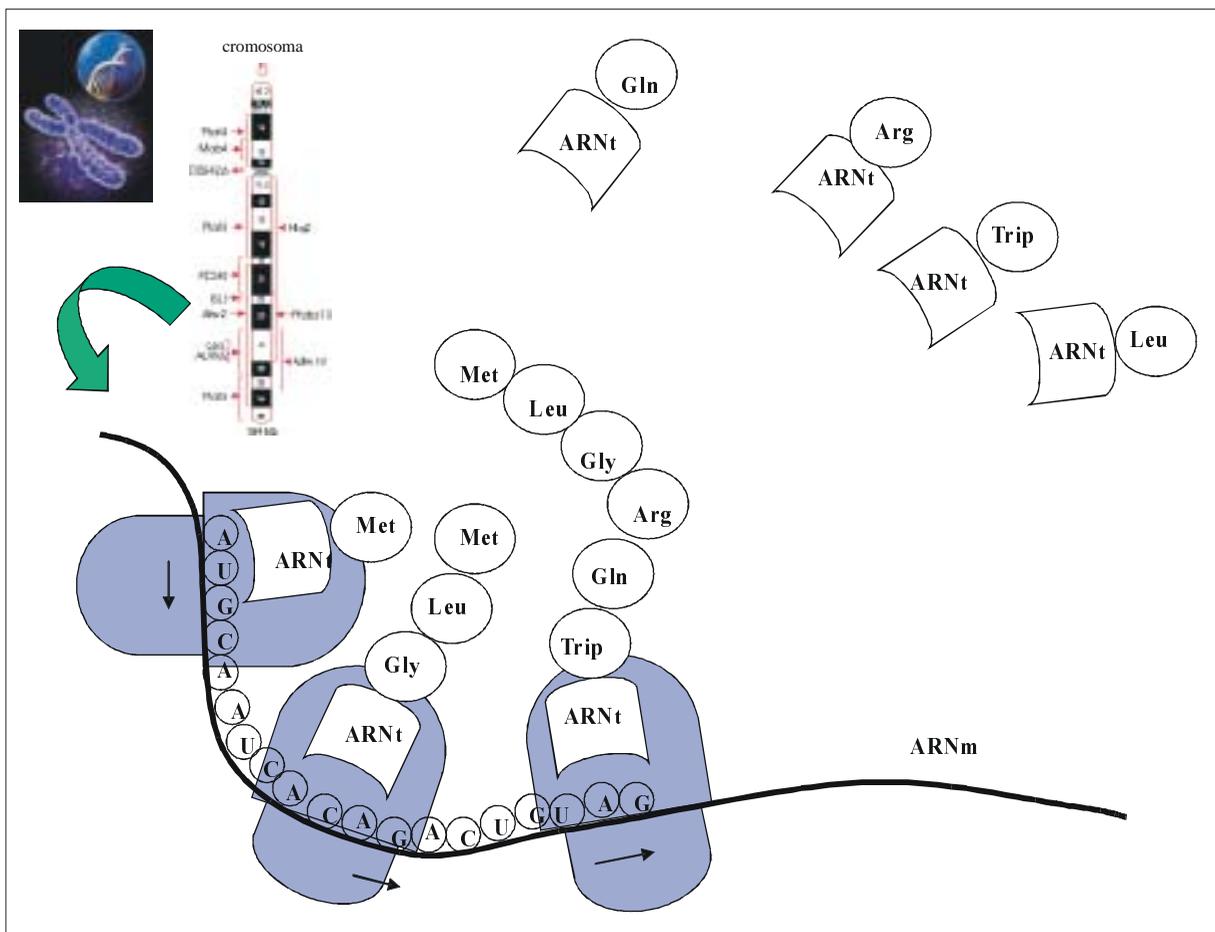


Fig. 7: Traducción del ADN en proteínas (cada gen se transcribe en un ARNm que será traducido en una única proteína).

El [código genético] es un código de tripletes (tres nucleótidos) que se leen a partir de un punto específico en el ARNm. De los 64 codones posibles en el código genético, 61 especifican aminoácidos individuales y 3 son codones de detención (STOP). La mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón ("sinónimos"). Estas redundancias confieren al código el carácter de "degenerado". La síntesis de todas las cadenas proteicas en las células procariontes y eucariontes comienza con el aminoácido metionina. En la mayoría de los ARNm, el codón de inicio (iniciador) que especifica esta metionina aminoterminal es AUG. Los tres codones stop (UAA, UGA y UAG) no especifican aminoácidos y constituyen señales de terminación (terminales) que marcan la terminal carboxilo de las cadenas proteicas en casi todas las células. La secuencia de codones (tripletes) que transcurre desde el codón de iniciación hasta el codón terminal se denomina [marco de lectura] {frameshift}. Esta disposición lineal precisa de ribonucleótidos, en grupos de tres, en el ARNm especifica la secuencia aminoácídica lineal exacta, y dónde comienza y termina la síntesis de la cadena proteica (Figura 8).

Durante la iniciación, el codón AUG para metionina actúa como codón de inicio en la gran mayoría de ARNm. Existen dos tipos de metionina-ARNt: ARNt^{-met_i}, que es capaz de iniciar la síntesis proteica (iniciación), y ARNt^{-met}, que sólo incorpora metionina en una cadena proteica en crecimiento (elongación). Durante el estadio inicial de la síntesis de proteínas se forma un complejo donde un ribosoma con un ARNm y ARNt activado se coloca en la posición correcta en el codón de inicio, para formar un complejo de iniciación 80 S.

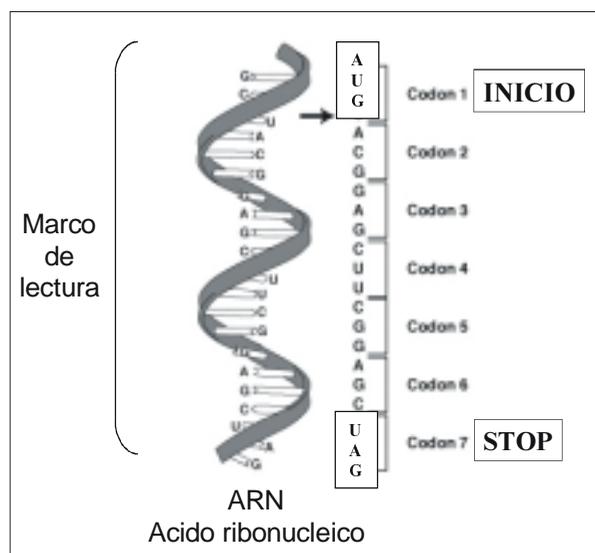


Fig. 8: Traducción del ADN en proteínas. Marco de lectura (ver el texto para explicación).

La elongación de la cadena proteica incluye tres pasos que se repiten una y otra vez:

- un aminoacil-ARNt se une con firmeza al sitio A sobre el ribosoma y aparea sus bases (anticodon) con el codón correspondiente del ARNm;
- se forma un enlace peptídico entre el aminoácido que ingresa y la cadena en crecimiento en el sitio P, con transferencia de la cadena peptídica al ARNt que ingresa. La formación del enlace peptídico se acompaña con un desplazamiento del ARNt que ingresa hacia el sitio P, y del ARNt ya sin carga hacia el sitio E. Por último,
- el ribosoma se transloca hacia el siguiente codón y el ARNt "viejo" se descarta del ribosoma.

Al igual que en la iniciación, la elongación requiere factores proteicos específicos e hidrólisis de GTP. Es probable que el ARN ribosomal (ARNr) catalice la reacción de peptidiltransferasa, donde se forman los enlaces peptídicos entre aminoácidos adyacentes.

Por lo general, la terminación es efectuada por dos tipos de factores: los que reconocen codones de detención y los que favorecen la hidrólisis del peptidil-ARNt. En células eucariontes, múltiples ribosomas se unen a un único ARNm para formar un polisoma circular: todos los ribosomas adosados traducen el ARNm al mismo tiempo. A medida que cada ribosoma completa la traducción y es liberado desde el extremo 3' del ARNm, es probable que las subunidades se reagrupen con rapidez en el extremo 5', lo cual aumenta mucho la eficiencia de la síntesis proteica.

Individualidad molecular en el hombre

"...algunas variantes génicas, importantes en la salud y la enfermedad, son el resultado de la selección natural..."³⁵

J. Bradbury

Las bases moleculares de las enfermedades genéticas se deben a diferentes expresiones génicas que determinan, por presiones de selección, entre otros factores, diferentes frecuencias alélicas. Una especie determinada se desarrolla en ambientes muy diversos, por lo cual la frecuencia de alelos presentes en dicha población será seleccionada para adaptarse a la diversidad ambiental, y no como un único tipo morfológico que encaje en un ambiente único. Una fuente importante de variación alélica y selección génica en el medio ambiente es el encuentro con diversos agentes infecciosos. Como ningún genotipo humano ofrece una resistencia máxima a todos los agentes posibles, las presiones selectivas por parte de una variedad de agentes infecciosos promoverán una heterogeneidad genética (polimorfismo) que influirá sobre la resistencia a estos agentes.

- La selección por agentes infecciosos presenta un buen ejemplo en la anemia drepanocítica. Un genotipo heterocigota, es decir, la presencia de un alelo mutado y otro normal, protege, al cambiar la estructura del glóbulo rojo, contra la infección del *Plasmodium falciparum*, común entre tribus africanas constantemente expuestas a la malaria, aun cuando el gen en su estado homocigota provoca una anemia grave. Otros agentes infecciosos tienen que ejercer presiones selectivas similares, aunque siguen sin determinarse los productos génicos específicos cuya selección determinan.

Las células de vertebrados manifiestan una variedad de antígenos específicos en la superficie celular, muchos de los cuales difieren de un individuo a otro. Estos antígenos (que dificultan, por ejemplo, el trasplante efectivo de órganos) pueden estar relacionados con la distribución histórica de importantes enfermedades infecciosas de la antigüedad³⁶. Existen entre 10 y 20 genes candidatos a brindar resistencia contra la malaria, codificando proteínas del sistema inmune, proteínas de la superficie celular y proteínas involucradas en la fisiología eritrocitaria³⁵. Los estudios de Tishkoff y col. han sugerido que en la deficiencia de G6FD eritrocitaria (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) la disminución de la actividad de la enzima causa anemia hemolítica, mostrándose con mayor frecuencia en áreas donde la malaria está o ha estado presente, sugiriendo que las variantes de G6FD que afectan su actividad podrían proveer protección contra dicha enfermedad. Tishkoff plantea que la selección de las variantes de la G6FD ocurrieron hace 10.000 años atrás en África, cuando la introducción de la agricultura (gran cantidad de personas viviendo en populosas comunidades) permitió el establecimiento del ciclo infeccioso mosquito-humano.

Pero el origen de los genes de restricción del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que previenen la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana - 1 (HIV-1) o lentifican la progresión del SIDA, no es tan claro. Se han identificado 15 genes de restricción del SIDA, muchos de los cuales tienen variaciones geográficas en la frecuencia alélica. Sin embargo, una evidencia fuerte de presión de selección se ha demostrado para sólo dos o tres genes de restricción del SIDA. Hace 700 años surgió la variante Δ -32 del CCR5, un coreceptor para el HIV-1. Pero el HIV-1 apareció en el siglo XX, por lo cual se postula a la *Yersinia pestis*, agente causal de la peste bubónica, o aún al virus de la viruela, como productores de presión de selección génica³⁵. Otros atribuyen a priones la causalidad en la presión evolutiva de la selección génica en individuos heterocigotas.

- También la dieta parece haber influido en la variabilidad génica. Cuando los seres humanos vivían como cazadores-recolectores, las variantes génicas pudieron haberse seleccionado a partir del abastecimiento intermitente de comida. Con el actual marcado sedentarismo, donde la comida siempre está disponible, esas mismas variantes pueden subyacer a la epidemia global de obesidad, diabetes y en-

fermedades cardíacas. El alelo 4 del gen que codifica para la apolipoproteína E (apoE4), presente en poblaciones forrajeras actuales (pigmeos), pudo haber brindado ventajas a nuestros ancestros, pero hoy día, dada la mayor longevidad y cambios en la dieta, se asocia con riesgo de enfermedad coronaria y Alzheimer³⁷.

- Entre las teorías que sostienen la selección por climas se postula que la fosforilación oxidativa, el sistema de producción mitocondrial de energía, depende de las 13 proteínas codificadas por el ADN mitocondrial (ADNmt). El genoma mitocondrial es el que determina el cambio de los carbohidratos y grasas en ATP –para el trabajo–, y el calor –para mantener la temperatura corporal–. Existen patrones de ARNm determinados por factores climáticos, confinados a regiones geográficas específicas. La distribución de calorías en calor versus la distribución de calorías en ATP está determinada por la eficiencia del acoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (un acoplamiento pobre se asocia con una mayor producción de calor; un mayor acoplamiento se asocia con una mayor producción de ATP). Este acoplamiento está determinado por las variaciones del ADNmt. Así, cuando las poblaciones migraron desde las regiones tropicales y subtropicales de África a las más frías de Europa y Asia, ellas tuvieron que incorporar más calorías a la dieta para sobrevivir a inviernos fríos. Esto seleccionó mutaciones en el ADNmt que redujeron la eficiencia del acoplamiento (mayor producción de calor) y por ende la producción de ATP. Como compensación, tuvieron que incorporar dietas más ricas en grasas, como en el norte de Europa³⁸. Estas condiciones eran favorables en aquellos tiempos; hoy día las poblaciones gozan de condiciones ambientales más controladas que hacen que las mitocondrias con buen acople energético (“tropicales”) y con mayor eficiencia en el acople de la fosforilación oxidativa estén en una sobrecarga crónica de calorías. Estas mitocondrias producen más radicales tóxicos del oxígeno cuando tienen exceso de calorías, por lo cual estas poblaciones están en mayor riesgo de presentar diabetes y enfermedades degenerativas que las que presentan variantes “norteñas” de ADNmt.

Proyecto genoma humano

“...La meta del proyecto es entender las instrucciones genéticas para los seres vivos. Conseguir las instrucciones es un gran trabajo; entender esas instrucciones puede consumir varios cientos de años...”

James Watson

Hace más de 20 años que es posible secuenciar cortas secciones del ADN gracias al uso de [enzimas de restricción], las cuales cortan al ADN en sitios específicos y permiten el estudio de múltiples segmentos cortos. Los fragmentos

pueden ser también obtenidos mediante copia del ARN mensajero a un nuevo bloque de ADN, llamado ADN complementario (ADNc); esta copia representa sólo los exones (genoma codificante). La reunión de todos los fragmentos de ADNc de un determinado tejido o tipo celular constituye las bibliotecas de ADNc {cDNA librarie}, disponibles hoy día al público. La reacción en cadena de la polimerasa {(PCR)} permitió la amplificación genómica que posibilitó el estudio completo del genoma humano.

En octubre de 1990 se decidió llevar a cabo el estudio sistemático de todo el genoma humano, en un emprendimiento conjunto de laboratorios de China, EE.UU., Francia, Alemania, Japón y Gran Bretaña, con una serie de objetivos intermedios:

- Completar un mapa físico del genoma de modo de tener hitos de referencia a lo largo de cada cromosoma.
- Desarrollar métodos para ubicar genes conocidos en los cromosomas.
- Desarrollar métodos de secuenciación rápidos y eficientes.
- Desarrollar áreas como la microrrobótica.
- Desarrollar herramientas de bases de datos y softwares adecuados para manejar e interpretar los datos del genoma.
- Formar recursos humanos.
- Explorar las implicancias éticas, legales y sociales de la investigación genómica.

Estos objetivos fueron cumplidos, lográndose además otros que se esperaban alcanzar mucho después:

- Un borrador avanzado de la secuencia del genoma del ratón (diciembre de 2002).
- Un borrador inicial de la secuencia genómica de la rata (diciembre de 2002).
- La identificación de más de 3 millones de variaciones genéticas humanas puntuales (polimorfismos de un solo nucleótido {SNPs}).
- La generación de ADN complementarios de extensión completa (cDNAs) para más del 70% de los genes conocidos del ratón y del hombre.

Todas las secuencias generadas por el Proyecto Genoma Humano han sido rápidamente enviadas a bases de datos públicas, estando disponibles gratuitamente a escala mundial, sin restricciones. Se han identificado más de 1.400 genes relacionados con enfermedades.

Genoma humano

El genoma humano es la totalidad del material genético de una célula. Comprende al genoma nuclear, constituido por el ADN cromosómico y el genoma mitocondrial, que contienen la información para la elaboración de todas las

proteínas requeridas por el organismo, las que determinan el aspecto, funcionamiento, metabolismo, resistencia a infecciones y enfermedades.

Nuestra secuencia genómica provee el único archivo de quiénes somos y de cómo hemos evolucionado como especie, incluyendo la unidad fundamental de todos los seres humanos³⁹. Entre los principales hallazgos del proyecto se pueden enumerar:

- El genoma humano contiene 3.164 millones de bases.
- Un gen promedio contiene 6.000 bases.
- El número total de genes está en alrededor de 30.000.
- Menos del 2% del genoma corresponde a la secuencia que codifica para las proteínas (genoma codificante).
- 50% del genoma son secuencias repetitivas.
- El 99,3% de la secuencia del ADN es exactamente la misma en todos los individuos.
- Se desconoce la función de un 50% de los genes descubiertos (aproximadamente 15.000).
- Todavía quedan alrededor de 400 brechas definidas sin secuenciar; ellas requieren el desarrollo de nuevas tecnologías para su secuenciación, aunque contienen pocos genes.

El proyecto genoma humano y la investigación médica

"...lo mejor está por venir..."

Francis S. Collins

Estudios genéticos

Mientras la determinación de las secuencias génicas y sus funciones ganan velocidad al correr del tercer milenio, los esfuerzos de la investigación biomédica se orientan hacia la mejor definición de los patrones de expresión génica que puedan explicar las diferentes enfermedades. La mayor parte de estos esfuerzos se dirigen hacia la definición de las variaciones interindividuales, las cuales se espera que jueguen un rol integral en el plan de tratamiento, en términos de mayor eficacia y menores efectos adversos a las drogas. Se confía que esta terapéutica racional basada en el genoma conduzca progresivamente a la era de la "medicina personalizada". Este abordaje utiliza la ayuda de la tecnología y la funcionalidad genómica para definir, predecir y monitorear la naturaleza de la respuesta de un individuo a los tratamientos con drogas, y a un diseño racional de nuevos fármacos.

Un estudio genético es el análisis del ADN, ARN, cromosomas, proteínas y/o ciertos metabolitos en humanos para analizar genotipos, mutaciones, fenotipos y cariotipos relacionados con enfermedades⁴⁰.

Esta definición refleja la amplitud de técnicas que pueden ser utilizadas en el proceso de análisis (Figura 9). El listado se

está actualizando continuamente y se puede acceder a las últimas incorporaciones en <http://www.geneclinics.org>⁴¹). Existe un amplio número de enfermedades hereditarias que pueden ser diagnosticadas por técnicas moleculares en la etapa prenatal, en recién nacidos, niños o adultos; enfermedades que pueden predecirse en personas sanas en riesgo, como así también es posible en algunos casos establecer el pronóstico y la respuesta a la terapéutica. Estos estudios son a menudo el mejor modo de confirmar el diagnóstico en un paciente con signos o síntomas sugestivos de enfermedad genética, o definir una conducta médica preventiva. Hoy es posible predecir que un paciente con una mutación identificada en el oncogen RET puede sufrir una neoplasia endócrina múltiple tipo 2 (MEN 2), o que un niño que haya heredado la mutación puede beneficiarse de una tiroidectomía profiláctica previniendo la aparición del carcinoma medular de tiroides⁴². El test de mutación para el oncogen RET puede identificar al 85-95% de los familiares afectados de pacientes con carcinoma medular de tiroides⁴³⁻⁴⁵. Ante signos y síntomas de la distrofia muscular de Duchenne, actualmente se pueden rastrear las grandes deleciones (60% de las mutaciones descritas para este gen)

o inversiones del gen de la distrofina⁴⁶ (Figura 10). Cientos de mutaciones diferentes pueden ser la causa de la enfermedad fibroquística del páncreas⁴⁷, y mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 están asociadas a la susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditarios⁴⁸. El test de la hemoglobina buscando la mutación HbS causante de la anemia drepanocítica en el ADN de las vellosidades coriales permite el examen prenatal⁴⁹. El diagnóstico temprano es esencial para proporcionar el tratamiento preventivo adecuado para las complicaciones de dicha enfermedad. Los tests citogenéticos se utilizan para diagnosticar desórdenes cromosómicos, en los cuales los cromosomas o segmentos cromosómicos están duplicados, [delecionados] o [translocados] a diferentes cromosomas (Figura 11). Estas pruebas permiten el diagnóstico, por ejemplo, del síndrome de Down, enfermedad genética raramente heredada que se debe a la presencia de un cromosoma 21 extra (trisomía del cromosoma 21), generalmente debida a una no disyunción durante la meiosis del óvulo o del espermatozoide⁵⁰⁻⁵².

El propósito de estos estudios genéticos es a menudo identificar miembros de una familia que son portadores, personas no afectadas pero que pueden engendrar niños

CONDICION	GENES O ALTERACIONES CROMOSOMICAS INVOLUCRADAS	USOS DEL TEST
Ataxia espinocerebelosa	SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA10, DRPLA	Diagnóstico, Predictivo
Enfermedad de Alzheimer familiar	PSEN1, PSEN2	Diagnóstico, Predictivo
Enfermedad de Canavan	ASPA	Diagnóstico, Prenatal
Pérdida de calor congénita Heredada no sindrómica	GJB2	Diagnóstico, Prenatal
Síndrome del cromosoma fragil	FMR1	Diagnóstico, Prenatal
Enfermedad de Huntington	HD	Diagnóstico, predictivo Prenatal
Síndrome de Ehler-Danlos Tipo vascular	COL3A1	Diagnóstico, Prenatal
Síndrome de Marfan	FBN1	Diagnóstico, Prenatal
Osteogénesis imperfecta tipo I – IV	COL1A1, COL1A2	Diagnóstico, Prenatal
Poliposis adenomatosa familiar	APC	Diagnóstico, Predictivo
Cáncer colorrectal no polipósico Hereditario	MLH1, MSH2, PMS2, MSH3, MSH6	Diagnóstico, Predictivo
Enfermedad de von Hippel Landau	VHL	Diagnóstico, Predictivo
Síndrome de Li Fraumeni	TP53	Diagnóstico, Predictivo
β - Talasemia	β-globina (HbB)	Detección de portadores-Diagnóstico prenatal
Hemofilia A	F8C	Pronóstico, detección de Portadores, prenatal
Hemofilia B	F9C	Detección de portadores, Diagnóstico prenatal
Diabetes insípida nefrogénica	AVPR2, AQP2	Diagnóstico, detección de Portadores, prenatal
Enfermedad renal poliquística (autosómica dominante y recesiva)	PKD1, PKD2, PKHD1	Predictivo, prenatal
Acondroplasia	FGFR3	Prenatal
Déficit de α1 antitripsina	AAT	Diagnóstico, predictivo
Cistinosis	CTNS	Detección de portadores, Prenatal
Galactosemia	GALT	Estudio en recién nacido, detección de portadores, prenatal
Neurofibromatosis tipo 1	NF1	Prenatal
Neurofibromatosis tipo 2	NF2	Predictivo, prenatal
Neoplasia endocrina múltiple tipo 2	RET	Diagnóstico
Distrofia muscular de Duchenne	Deleción o inversión estructural en regiones codificantes del gen de la Distrofia muscular de Duchenne	Diagnóstico
Anemia de células falciformes	Mutación del HbS	Diagnóstico
Fibrosis quística	Mutaciones del CFTR	Diagnóstico
Síndrome de Down	Cromosoma 21 extra	Diagnóstico
Síndrome de la deleción 22q11	Deleción en cromosoma 22	Diagnóstico
Sobrecarga de Hierro	Mutaciones C282Y y H63D en el gen HFE	Diagnóstico
Trombosis venosa	Mutación del factor V de Leiden	Predictivo?
Cáncer de mama y ovario	BRCA 1, BRCA 2	Predictivo, diagnóstico
Síndrome de hipertermia maligna	Mutaciones del RYR1 en el cromosoma 19 (recordar la heterogeneidad del SHM)	Diagnóstico, predictivo

Fig. 9: Estudios genéticos (ver el texto para explicación; tomado de 41).

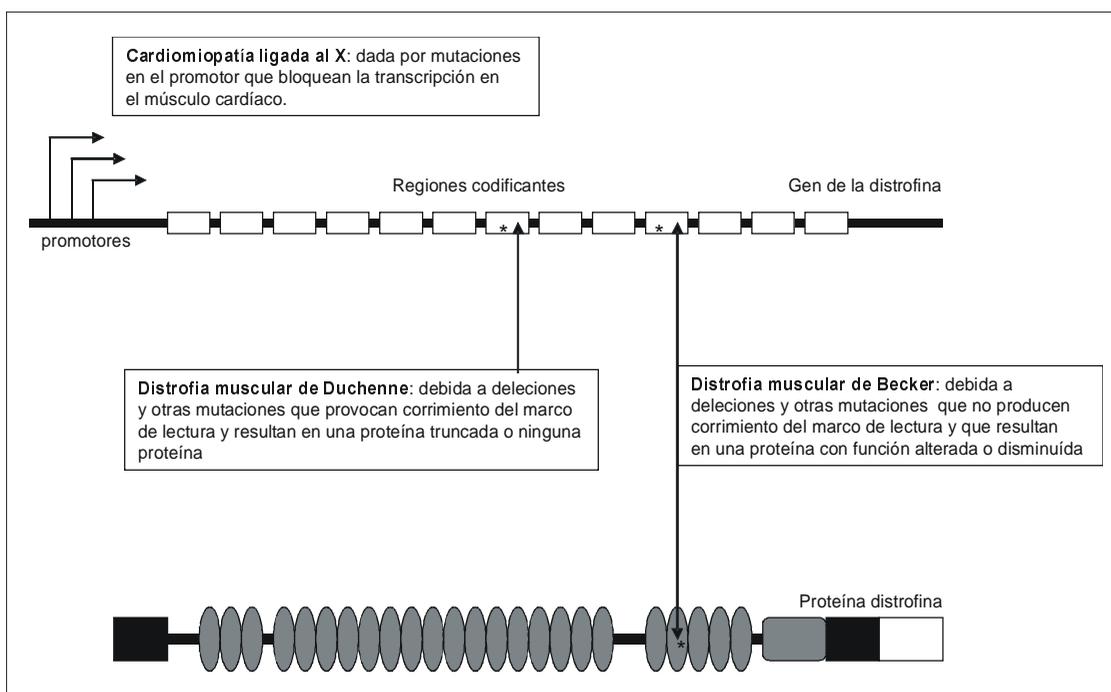


Fig. 10: Alteraciones del gen de la distrofina (ver el texto para explicación; tomado de 46).

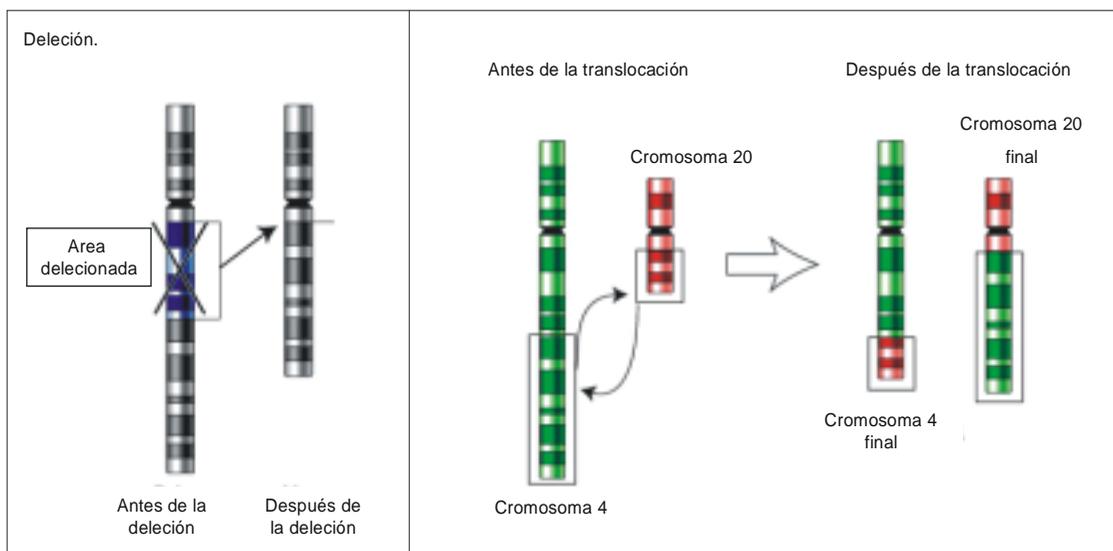


Fig. 11: Alteraciones cromosómicas (modificado de 42) (ver el texto para explicación).

con la enfermedad, y son a menudo realizados por razones principalmente personales y no médicas. Diferente es el caso de pacientes susceptibles para sufrir el síndrome de hipertermia maligna (HM)⁵³, los cuales pueden vivir con esta miopatía subclínica en tanto y en cuanto no se expongan a

anestesia general con agentes halogenados y/o succinilcolina. La importancia del correcto diagnóstico de esta enfermedad en sobrevivientes de un episodio sospechoso de HM radica en que los familiares pueden también estar afectados por esa dolencia heredable en forma dominante.

Generalmente es un diagnóstico presintomático en familias de un paciente sospechoso o diagnosticado de HM. El test habitual es el de contractura ante la exposición a cafeína-halotano in vitro: se enfrenta un trozo de músculo vasto lateral o medial, obtenido por excéresis quirúrgica, a cafeína-halotano. Si bien la fibra extraída en el adulto no representa una gran masa muscular (2 g), en niños pequeños puede tener mayor significancia (además de la renuencia de los padres a realizar la biopsia). Las investigaciones moleculares en la HM han mostrado una considerable heterogeneidad en [locus] y alelos. Más del 50% de las familias de HM muestran vínculos genéticos con el gen del receptor rianodina del músculo esquelético (RYR1) en el cromosoma 19q13.1⁵⁴, y otros [loci] han sido identificados como loci candidatos en los cromosomas 1q32, 7q11.23-21.1, 3q13.1 y 5p. Más de 30 mutaciones han sido descritas en el gen RYR1, algunas de ellas detectadas con una frecuencia de entre el 0,3 y el 27%, mientras que otras sólo han sido identificadas en familias únicas⁵⁵⁻⁵⁹ (Figura 12, tomado de⁵³). De acuerdo con las recientemente publicadas guías de diagnóstico, la presencia de mutaciones permite la detección de susceptibilidad a la HM. Sin embargo, debido a que la HM tiene heterogeneidad génica y alélica, y a las discordancias existentes entre el test de contractura muscular y el test genético, un diagnóstico negativo de HM no es absolutamente establecido por estudio genético, por lo que en estos casos debe realizarse el test de contractura muscular (Figura 13)⁶⁰.

Una revolución que progresa

Santiago Grisolia, premio Príncipe de Asturias de investigaciones científicas, dijo que "...en poco tiempo se podrá conocer el genoma humano, individualizado en un día, tras la extracción de sangre en un hospital o centro médico, a un costo de 1.000 euros..."⁶¹. Pero el patentamiento de se-

cuencias génicas por empresas comerciales (algunas secuencias todavía hoy no se sabe para qué sirven) puede disminuir el optimismo del objetivo de determinar un perfil genómico por menos de 1000 euros. Si por cada gen testeado se debiera pagar 1 dólar en concepto de patentes, y asumiendo que de los 30.000 genes conocidos sólo la mitad tuvieran importancia clínica, la determinación genética costaría por lo menos 15.000 dólares, valor lejano a los 1.000 euros estimados⁸. Sin embargo, se están invirtiendo grandes sumas de dinero para descubrir métodos de secuenciación que permitan lograrlo (la fundación Craig Venter ha establecido un premio de 500.000 dólares para quien logre el objetivo del estudio del genoma por 1.000 dólares⁶²).

Genómica

Desde la época de Gregor Mendel, la herencia de determinados caracteres en los seres humanos ha llamado la atención de la comunidad científica. La genética es el estudio de los genes (genotipo) y sus efectos (fenotipo) en los seres humanos. Del avance de la genética, la biología molecular y la bioinformática se nutre una nueva rama del conocimiento, la genómica, que estudia todos los aspectos involucrados en el "dogma central de la biología", desde la duplicación del ADN a la transcripción en ARN y la traducción en proteínas. Asimismo, estudia los aspectos involucrados en el control de la expresión génica y las variantes génicas (genómica funcional)²⁴, y las técnicas conexas al estudio de los genes y sus funciones.

Genómica comparativa-biología evolucionista

La versión completa de la secuencia del genoma humano permitirá a los investigadores aprender más de su cons-

Exon	Posición de la mutación y cambio de codon	Cambio de AA en RYR1	Comparación funcional con RYR1 wild type		Fenotipo	Incidencia estimada
			sensibilidad Cafeína	sensibilidad Halotano		
2	103TGC → CGC	Cys 35 → Arg	no diferencia	aumentada	SHM	Una familia
6	487CGC → TGC	Arg 163 → Cys	aumentada	aumentada	SHM y/o ECC	2 %
9	742GGG → AGG	Gly 248 → Arg	aumentada	aumentada	SHM	Una familia
11	1021GGG → AGG	Gly 341 → Arg	aumentada	aumentada	SHM	6-10 %
12	1209ATC → ATG	Ile 403 → Met	aumentada	aumentada	ECC, desconocida para SHM	Una familia
14	1568TAT → TCT	Tyr 522 → Ser	aumentada	aumentada	SHM y/o ECC	Una familia
15	1654CGG → TGG	Arg 522 → Trp	aumentada	aumentada	SHM	Una familia
17	1840CGC → TGC	Arg 614 → Cys	aumentada	aumentada	SHM	4-9 %
17	1841CGC → CTC	Arg 614 → Leu	aumentada	aumentada	SHM	2 %
39	6487CGC → TGC	Arg2163 → Cys	aumentada	aumentada	SHM	4 %
39	6488CGC → CAC	Arg2163 → His	aumentada	aumentada	SHM y/o ECC	Una familia
45	7300GGA → AGA	Gly2434 → Arg	aumentada	aumentada	SHM	4-10 %
45	7304CGC → CAC	Arg2435 → His	aumentada	aumentada	SHM y/o ECC	Una familia
46	7372CGC → TGC	Arg2458 → Cys	aumentada	aumentada	SHM	4 %
46	7373CGC → CAC	Arg2458 → His	aumentada	aumentada	SHM	4 %

Fig.12: Lista de mutaciones del RYR1 potencialmente causantes de susceptibilidad al síndrome de Hipertermia Maligna (SHM) y Enfermedad del Cuerpo Central (ECC). (Tomado de 53)

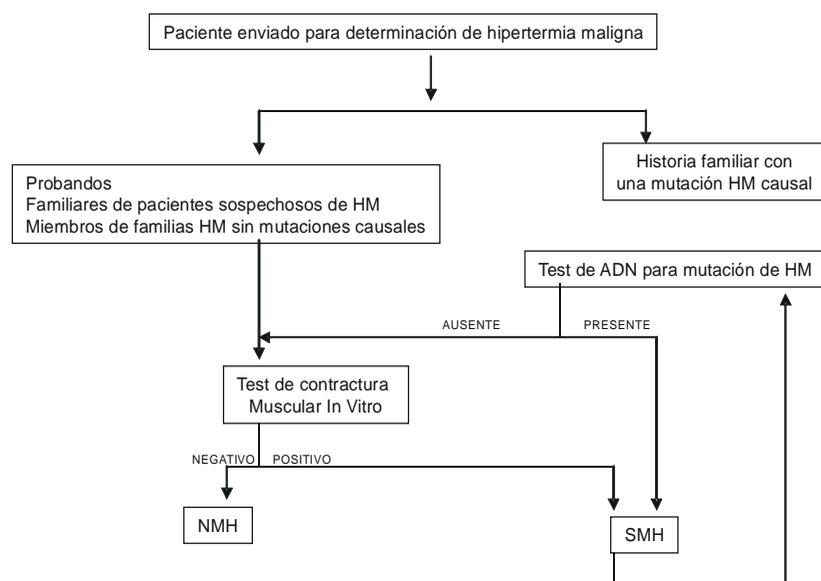


Fig. 13 : Algoritmo sugerido para el estudio de la susceptibilidad al síndrome de Hipertermia Maligna. (Tomado de 53). (HM: Hipertermia maligna; NMH: Negativo para Hipertermia maligna; SHM: Sensible para Hipertermia maligna; ADN: Acido Desoxirribonucleico). (Tomado de 53)

titución y función, comparándolas con las secuencias genómicas de otras especies, como la rata, el ratón o la mosca de la fruta⁷. Esto permitirá una más eficiente predicción de la estructura génica y su función, y quizás podría posibilitar un mejor uso de modelos animales para definir y validar blancos para el desarrollo de drogas, y predecir el resultado de estudios clínicos²⁴.

Antropología molecular

Los modernos antropólogos utilizan la genética molecular para estudiar los cambios de las poblaciones humanas a lo largo del tiempo (orígenes, patrones migratorios e historia cultural). La manifestación génica de patrones de adaptación ocurridos a principios de la hominización sirven de materia de estudio para la antropología molecular³⁵.

Farmacogenómica

La farmacogenética y farmacogenómica se ocupan de la caracterización fenotípica y genotípica de los polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de fármacos y en receptores dirigidos a una monitorización de los sujetos sanos o enfermos participantes en ensayos clínicos.

La farmacogenética, combinación de la genética, la farmacología y la bioquímica, describió inicialmente los estudios de las bases genéticas de la terapéutica^{63,64}. La

farmacogenómica es un término más amplio y reciente que agrega las nuevas ciencias de la biología molecular, la genómica y la bioinformática con sus tecnologías asociadas. Aunque el campo ha crecido y su alcance se extendió grandemente, su propósito sigue siendo el mismo: entender las razones subyacentes de la respuesta humana diferencial a los [xenobióticos]⁶⁵. Los conceptos corrientes en la terapia con drogas a menudo involucran el tratamiento de grandes lotes de población como grupos, más allá de las diferencias genéticamente determinadas de un individuo frente a una droga. La farmacogenómica, por el contrario, puede ayudar en el hallazgo de una terapia efectiva en pequeñas subpoblaciones de pacientes, los cuales, a pesar de manifestar el mismo fenotipo de enfermedad, se caracterizan por perfiles genéticos diferentes. Se ha estimado que sólo un tercio de los pacientes gozan de los beneficios de la terapéutica prescrita. En los restantes dos tercios, la medicación puede no tener el efecto deseado o ser pobremente tolerada. Los efectos adversos en los pacientes hospitalizados en EE.UU. pueden llegar a ser de hasta 2 millones de casos al año, siendo 100.000 los casos de desenlace fatal⁶⁶.

La farmacogenómica aborda la conexión entre los genes y la respuesta individual a las drogas. Como tal, el campo cubre una vasta área que incluye:

- La investigación básica en el descubrimiento de drogas.
- Las bases genéticas de la farmacocinética y farmacodinámica.

- Los nuevos desarrollos de drogas.
- Los testeos genéticos y el manejo clínico del paciente.

Últimamente la farmacogenética se ha propuesto predecir la respuesta genética del paciente a drogas específicas, como un medio para entregar el mejor tratamiento médico posible. Prediciendo la respuesta a las drogas de un individuo, será posible incrementar el éxito de las terapias y reducir la incidencia de efectos adversos colaterales. Una droga para ser aprobada debe mostrarse apropiadamente segura y efectiva, y la evaluación se realiza sobre bases estadísticas dentro de una población de pacientes. Sin embargo, es raro que una droga sea segura y efectiva para todos. La terapéutica a menudo falla en su porcentaje de efectividad, y a menudo causa una cantidad de efectos adversos. Además, el uso a escala mundial de estas drogas ha revelado una sustancial diferencia interindividual en la respuesta terapéutica. Cualquier droga administrada puede ser terapéutica en algunos individuos e inefectiva en otros, y mientras algunos manifiestan efectos adversos a ellas, otros individuos no son afectados. Con frecuencia, diferentes mecanismos moleculares subyacen a los efectos terapéuticos y adversos. La variabilidad inherente entre individuos tiene un significativo efecto en la calidad y costo del cuidado de la salud. Analizada la eficacia de drogas mayores en varias enfermedades importantes, como se puede apreciar en la Figura 14⁶⁷, se ve que el mayor porcentaje de respondedores se manifiesta durante el uso de analgésicos no opioides (inhibidores de la COX₂, 80%), y el menor para la quimioterapia por cáncer (25%). Muchas otras tienen un rango de respuesta que va del 50 al 75%. La seguridad de las drogas también varía de droga a droga y de enfermedad a enfer-

Area Terapéutica	% de Eficacia
Alzheimer	30
Analgésicos (Cox-2)	80
Asma	60
Arritmias cardíacas	60
Depresión	62
Diabetes	57
Incontinencia	40
Migraña (aguda)	52
Migraña (profilaxis)	50
Oncología	25
Osteoporosis	48
Artritis reumatoidea	50
Esquizofrenia	60

Fig. 14: Porcentaje de respuesta a tratamientos con diferentes drogas mayores (tomado de 67).

medad, pero algunas de ellas tienen efectos clínicos de importancia. Esto ocurre a pesar de los esfuerzos de los laboratorios y compañías farmacéuticas para desarrollar drogas más seguras, y de las agencias regulatorias que tratan de mantener estrictas guías de seguridad.

El propósito de la farmacogenómica clínica es distinguir entre aquellos pacientes que responderán más o menos a una determinada droga o a la inversa, aquellos que tengan menos riesgos para desarrollar un evento adverso. El genotipo de un paciente necesitaría ser determinado sólo una vez para un gen determinado, ya que, exceptuando la ocurrencia de mutaciones muy raras, éste no cambia. Con esta información se podrían maximizar las mejores elecciones en el tratamiento con drogas, aumentando la eficacia y disminuyendo el riesgo de reacciones adversas⁶⁸.

Polimorfismos en la secuencia genética. Polimorfismo de nucleótido único (SNPs)

Muchas enfermedades comunes, e incluso respuestas a drogas, han mostrado estar influenciadas por diferencias genéticas heredadas. Si una región del genoma humano es secuenciada en dos individuos elegidos al azar, el 99,3% del ADN estudiado será idéntico⁶⁹. Así, muchas de las variaciones genéticas entre individuos resultan de cambios en sólo el 0,7% del genoma⁷⁰ (lo que no es poco teniendo en cuenta que el 0,7% de un genoma de 3.164 millones de bases correspondería a 22.148.000 de bases). Comienza a ser evidente que hay una variación sustancial en las secuencias de ADN entre dos individuos en varios puntos a lo largo del genoma^{71,72}, aunque su representación génica es estrecha. A veces ocurre una mutación puntual en un par de bases en una sección del genoma, lo cual resulta en una [inserción] (I) (se agrega un nucleótido) o [delección] (D) (se elimina un nucleótido) incorrecta de un nucleótido. Los pacientes pueden resultar homocigotas (II o DD) o heterocigotas (ID) para cualquiera de las dos variantes alélicas. Así, un [polimorfismo] describe un rasgo monogénico que existe en la población al menos en dos variantes observables. La expresión [alelo "wild-type"] se usa para referirse al genotipo corriente que se adopta como estándar. Más frecuentemente, las variaciones de secuencias son discretos cambios de sólo un nucleótido referidas como [polimorfismo de un solo nucleótido] {SNP's}, los cuales se estima que ocurren con una frecuencia de 1 cada 800 a 1000 nucleótidos^{71, 73-76}. Así, por cada 1.000 nucleótidos, el promedio de identidad nucleotídica en una población podría diferir entre una de dos copias de un cromosoma dado en una frecuencia sustancial a lo largo de la población (polimorfismo bialélico: la identidad nucleotídica de esta posición polimórfica está generalmente referida a 1 de 2 posibilidades en humanos (1 de 2 alelos⁷¹, Figura 15⁷⁷). Ante SNPs en ADN no codificante es difícil poder discernir un impacto en la estructura y/o la función de proteínas expresadas, o su nivel de expresi-

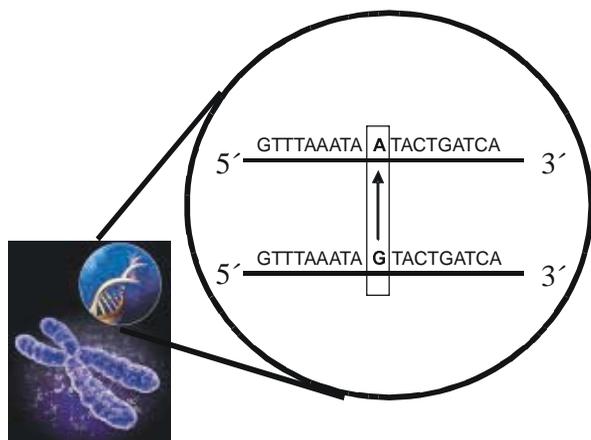


Fig. 15: Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (modificado de 80)

Posición y tipo del SNP	Nº de pb por SNP (aprox)
Codificante	1250
Sinónimos	662
No sinónimos	1754
No codificante	1176
5'UTR	1470
intron	952
3'UTR	1190

Fig. 16: Frecuencia estimada de SNPs en el genoma humano de acuerdo a su posición y tipo (tomado de 81). (SNP: polimorfismo de un solo nucleótido; UTR: regiones intraducibles; pb: pares de bases)

sión. Por contraste, los SNPs dentro de regiones codificantes o en elementos de control de un gen pueden tener un efecto sustancial en la expresión proteica. Los SNPs dentro de regiones codificantes {(cSNPs)} pueden resultar tanto en un cambio en un aminoácido en la proteína expresada, con la aparición o no de un fenotipo anormal (rasgo visible), como en un cambio de codón sin efecto sobre el aminoácido, y sin cambios en la proteína expresada. La frecuencia de SNPs varía de acuerdo con su posición y tipo⁷⁸ (Figura 16).

Los SNP´s tienen un gran potencial para ser utilizados en estudios de mapeo genético, en los cuales se localizan y caracterizan genes que son importantes en enfermedades y funciones biológicas humanas⁷⁹.

Existen SNPs dentro de secuencias que codifican proteínas^{71,75}. La presencia de una determinada variante alélica de un SNP específico puede ser implicada como factor causal en desórdenes genéticos humanos. Así, el screening para una variante alélica individual podría ayudar a la detección

de una predisposición genética a la enfermedad o a su causa. También pueden jugar un rol en la etiología de afecciones poligénicas como el asma y la hipertensión.

Los SNPs pueden ser utilizados como marcadores genéticos para los estudios de mapeos genéticos^{71,74,75,80}, lo cual posibilita la localización e identificación de genes de importancia funcional.

Aun cuando los SNPs no estén directamente involucrados en la etiología de la enfermedad, es posible que haya una relación posicional llamada [desequilibrio de enlace o ligadura] {linkage disequilibrium}. Algunos de estos SNPs pueden analizarse conjuntamente con sus vecinos próximos del mismo cromosoma para determinar desequilibrios de ligamiento. Decimos que existe desequilibrio de ligamiento en una región cromosómica cuando hay grupos de marcadores (denominados haplotipos) que tienden a transmitirse conjuntamente. Aquí, una enfermedad genética de aparición frecuente en una población particular es consecuencia de una mutación producida muchas generaciones atrás. Este cromosoma ancestral portará marcadores estrechamente ligados que se conservarán durante muchas generaciones, aunque el valor del desequilibrio disminuye por recombinaciones sucesivas que “disgregan” los haplotipos ancestrales a lo largo de las generaciones. Los marcadores que se encuentran más alejados en el cromosoma tenderán a estar más separados del gen relacionado con la enfermedad por recombinación. Desde el punto de vista del ligamiento, los marcadores muy alejados en un mismo cromosoma se comportan prácticamente como si estuvieran en cromosomas diferentes, mientras que los más cercanos al gen relacionado con la enfermedad permanecerán asociados a él. Por lo tanto, los marcadores más informativos a utilizar en el diagnóstico indirecto (donde no se busca la mutación) de patologías hereditarias serán los intragénicos (principalmente los intrónicos), es decir, los que se encuentren dentro del gen relacionado con una determinada enfermedad, ya que es mínima la probabilidad de que haya ocurrido una recombinación que desligue la mutación génica del marcador analizado mientras que si se utilizan marcadores que mapean fuera del gen esa probabilidad aumenta considerablemente, y con ella el error del estudio. A través de la evaluación de la distribución de marcadores específicos en familias con varias generaciones de individuos afectados dentro de una población, los genetistas pueden identificar marcadores de ADN estrechamente asociados con la enfermedad, y así localizar el gen asociado a ella dentro de una región de tamaño bastante reducido. A esto se lo denomina Clonado Posicional. Se ha propuesto que un set de 3.000 marcadores (SNPs) podría ser suficiente para estudios de mapeo de todo el genoma en humanos. Un mapa de 100.000 o más SNPs había sido propuesto como una meta final para hacer realidad estudios de mapeo genético en grandes poblaciones^{81,82}. Tecnologías capaces de genotipificar miles de muestras de ADN individuales en forma segura, rápida y costo efectivo son necesarias para hacer posi-

Método	Referencia
-Secuenciación de productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	86, 87
-Análisis directo de masa de productos de PCR	88
-Análisis de productos de PCR alelo-específico o ligasa Chain reaction (LCR)	89, 90
-Análisis de productos de RFLP-PCR	91, 92
-Minisequenciación	93, 94, 95
-Análisis de muestras de hibridización de ácidos nucleicos peptídicos	96, 97, 98
-Análisis directo de productos de clivaje invasivo	99

Fig. 17: Abordajes para el análisis de SNP utilizando MALDI-TOF MS. (Tomado de 83). (PCR: reacción en cadena de la polimerasa; LCR: reacción en cadena de la ligasa)

ble estos estudios⁸². Una amplia variedad de técnicas de tipificación de SNPs han sido desarrolladas en recientes años^{71,83-85} (Figura 17)⁸⁶⁻⁹⁹. Estimulados por las posibilidades de investigación en SNPs, centros académicos internacionales (los Institutos Nacionales de Salud {NHI} de EE.UU., entre ellos), compañías farmacéuticas (AstraZeneca, Bayer, Pfizer, SmithKline Beecham y Novartis) y fundaciones privadas (Celera Genomics entre otras) se unieron en 1999 para crear el SNP Consortium[®], y elaboraron un catálogo de más de un millón de SNPs¹⁰⁰ que debería servir para el estudio de los vínculos entre genes y enfermedad¹⁰¹⁻¹⁰³. Con la posibilidad de realizar mapas de SNPs de alta resolución y la capacidad de utilizar el [microarray de ADN] para efectivamente explorarlo, se podrán realizar amplios estudios de asociación genómica durante estudios clínicos, posibilitando identificar genes susceptibles de producir enfermedad, para pronóstico, descubrimiento de drogas y selección de tratamientos. Si existe un alto riesgo de enfermedad, cuantificado por el patrón de SNPs del paciente, podrían establecerse tratamientos preventivos y ajustes en el estilo de vida (dieta, ejercicio, etc.) Un mapa genético de SNPs también podría contener las variantes genéticas importantes para el transporte de drogas, metabolismo e interacciones con receptores, tópicos relevantes a la hora de seleccionar un tratamiento farmacológico⁷². Más aún, este mapeo podría servir para alertar al médico de que es necesario un cuidadoso monitoreo de la dosificación de la droga en un paciente determinado. Muchos transportadores de drogas son polimórficos. Además, la mayoría del metabolismo de drogas dependientes de fase I y II es realizada por enzimas polimórficas, las cuales pueden producir abolición, alteración cuantitativa o cualitativa, o aumento del metabolismo de drogas. Se ha descrito la duplicación y la amplificación de genes activos, muchas veces en respuesta a componentes dietarios que han resultado en una selección de alelos con múltiples genes no inducibles. Varios ejemplos existen donde sujetos que portan ciertos alelos sufren por la pérdida de eficacia de una droga a causa del metabolismo ultrarrápido causado por genes múltiples o por la inducción de la expresión génica o, alternativamente, efectos adversos dados por el tratamiento farmacológico como resultado de la presencia de alelos de-

fectuosos. La información acerca del rol de los receptores polimórficos para la eficiencia de tratamientos con drogas es más escasa, aunque hay casos prometedores en el tratamiento del asma con drogas donde la eficiencia puede ser mejorada con la genotipificación predictiva para blancos de drogas. Además, ciertos polimorfismos pueden ser utilizados como marcadores para la optimización de la terapia farmacológica¹⁰⁴. Se sabe que la genotipificación predictiva es beneficiosa en un 10-20% de los tratamientos farmacológicos, y esto permite la prevención de causalidades por reacciones adversas farmacológicas, lo cual mejoraría la salud en una significativa fracción de la población. En el 15 al 40% de los casos, la penetrancia del polimorfismo genético es menos importante a causa de una influencia poligénica en el resultado a drogas, y en el 50% de los casos la farmacogenética podría no tener influencia a causa de otros factores fisiológicos y ambientales más importantes¹⁰⁵.

Sin embargo, este abordaje puede resultar extremadamente dificultoso en el corto tiempo. El resultado de un tratamiento con drogas representa un complejo fenotipo codificado por docenas, si no centenares de genes, y afectados por multiplicidad de factores ambientales. Por lo tanto, generalmente se ve un gradiente de respuesta. Los estudios de fenotipo de actividad de enzimas en sangre (cuando son posibles) son en general más exitosos que la genotipificación del ADN para predecir un resultado inequívoco de la terapia con drogas en un paciente determinado. La fenotipificación con drogas de ensayo no ha tenido éxito en general a causa de la solapada especificidad del sustrato, no solo por las enzimas que metabolizan drogas, sino también por los transportadores, receptores, canales iónicos, factores de transcripción y otros blancos de drogas; las interacciones entre drogas, la inducción e inhibición de enzimas y los múltiples caminos también presentan problemas de difícil resolución (enzimas, transportes, segundos mensajeros, transducción de señales). La genotipificación ha sido propuesta para predecir la disposición de drogas, eficacia, toxicidad y resultado clínico, pero el éxito de la genotipificación en la terapia individualizada con drogas habitualmente parece lejana dado por algunos defectos (frecuencia de los sitios variables de ADN, diferencias étnicas, mezclas) y com-

plejidades (plasticidad del genoma, múltiples mecanismos para determinación de tamaños y localizaciones de bloques de haplotipos). La genómica es una herramienta importante en la investigación básica, aunque será difícil aún incorporar pruebas genotípicas en la práctica clínica en un futuro próximo. Lo mismo puede decirse para la [transcriptómica] y la proteómica. Los nuevos campos de la [metabonomía] y la [fenómica] podrían ofrecer soluciones para anticipar y disminuir los riesgos individuales de reacciones adversas a drogas en cada paciente. Sin embargo, los tests para estas pruebas demorarán entre 5 y 10 años¹⁰⁶.

Así, en el futuro, la farmacogenómica jugará un rol integral en el estudio de la enfermedad, en el descubrimiento y desarrollo de drogas y específicamente en la selección del tipo de droga. Más aún, podrá proveer información muy útil en la selección del régimen de dosificación para un paciente individual. El principio de “una droga para todos” utilizado actualmente, con sus márgenes de seguridad especificados con la dosis efectiva 95 (ED95) y la dosis letal 95 (LD95), con el abordaje farmacogenómico, podría evolucionar en uno más individualizado, donde las drogas son efectivamente optimizadas según un perfil genético único¹⁰⁷ (Figura 18¹⁰⁸). Actualmente, las drogas producidas para grandes lotes de población, con una eficacia probada y pocos efectos adversos (drogas de “blockbuster”⁶⁸), son la base de las enormes ganancias de empresas farmacéuticas que año tras año ingresan miles de millones de dólares en sus balances. Esto posibilita la investigación de nuevos desarrollos con las mismas características (amplio margen de seguridad, eficacia probada), pero sigue dejando fuera del mercado a pequeños lotes de población con marcadores genéticos diferentes y diferente perfil farmacodinámico. El uso de las nuevas drogas inhibitoras de la COX₂ sigue este modelo, disminuyendo los efectos adversos en el aparato gastrointestinal y manteniendo su efectividad terapéutica. Sólo un pequeño número de pacientes desarrolla esos efectos adversos, y las drogas tradicionales son mucho menos caras. Esto aboga aún por la teoría de una droga para todos. Si colocar una nueva droga en el mercado cuesta alrededor de 500 millones de dólares, esto hace imposible desarrollar una droga para un pequeño lote de pacientes. Incluso, el pensar en el desarrollo de una nueva droga es utópico para muchos laboratorios de capitales nacionales¹⁰⁹. Esta cuestión es un dilema ético y económico aún sin solución.

La farmacogenética también se aplica a proteínas producidas por bioingeniería y terapia génica. Puede esperarse que la variabilidad genética humana afecte a todas las modalidades de tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer de mama con trastuzumab (Herceptin®), un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor HER₂ desarrollado por Genentech Inc., está vinculado a la sobreexpresión del HER₂. Esta sobreexpresión se correlaciona con pobre pronóstico clínico (aumenta la agresividad del tumor) y sirve como marcador de respuesta al tratamiento con tras-

tuzumab, tanto solo o en combinación con quimioterapia^{110,111}.

En pocos casos, los tests genéticos han comenzado a encontrar su camino en la práctica clínica, haciendo un abordaje proactivo hacia una terapia individual posible. En la quimioterapia de la leucemia linfocítica aguda, la administración de drogas como la 6-mercaptopurina, la 6 tioguanina y la azatioprina pueden causar una severa toxicidad hematológica, o aun la muerte, en pacientes que poseen una variante no funcional [(null allele)] de la tiopurina metiltransferasa. Los estudios funcionales de la tiopurina metiltransferasa en glóbulos rojos, o alternativamente la genotipificación, pueden identificar los pacientes (aproximadamente 1 en 300) que son homocigotas para los alelos que codifican para la enzima no funcionante, incapaz de metabolizar las drogas a sus formas metiladas inactivas. Estos pacientes pueden ser seguramente tratados con dosis 10 a 15 veces menores a las comúnmente prescritas^{68,112}. Así, la genotipificación y los análisis enzimáticos funcionales han comenzado a ser una práctica estándar en grandes centros de tratamiento del cáncer¹¹³.

Toxicogenómica

“...los genes son sólo una pequeña parte de nuestro conjunto; el ambiente tiene un impacto formidable...”

Eric Lander

La toxicología ha evolucionado lentamente. Los métodos tradicionales para llevar a cabo sus determinaciones se han vuelto obsoletos para el intento de investigar las complejas interacciones bioquímicas y genéticas que participan en el desarrollo de la injuria tóxica. Sólo se podía estudiar un determinado químico y su efecto en cada paso, pero la incorporación de las nuevas tecnologías genómicas podría liberar los límites de la toxicología, posibilitando el análisis global de múltiples eventos y caminos moleculares a la vez. Algunas drogas y contaminantes presentes en el ambiente pueden provocar cambios en la expresión génica que se manifiestan como reacciones adversas. Gracias a la posibilidad de utilizar la técnica de microarray, hoy es posible analizar un amplio pool génico y sus manifestaciones proteicas a fin de establecer los cambios ocurridos ante los xenobióticos. Por esto, la toxicogenómica tiene hoy un rol de avanzada en la investigación biomédica. Además de su papel en la evaluación de la toxicidad de nuevos productos comerciales (fármacos, pesticidas, etc.), los toxicólogos son una parte importante en la línea de la identificación de peligros ambientales y en la determinación de su rol en el desarrollo de enfermedades en los seres humanos y sobre el ecosistema. Estas actividades son muy importantes, ya sea para el desarrollo de productos seguros o para la toma de decisiones regulatorias de salud ambiental¹¹⁴.

La genómica podría desarrollar cinco áreas de la toxicología:

- Desarrollo de nuevas y más amplias baterías de pruebas para el estudio de toxicidad y carcinogenicidad.
- Determinación de las bases genéticas de las diferencias en la susceptibilidad o respuesta a drogas u otros xenobióticos.
- Desarrollo de nuevos marcadores biológicos para la cuantificación de exposición a tóxicos.
- Determinación de mecanismos y vías metabólicas involucrados en el desarrollo de enfermedades o injuria tóxica.
- Desarrollo de herramientas y recursos para usar en grandes estudios poblacionales.

Secuenciación Genómica

Celera Genomics (Rockville, MD, USA): <http://www.celera.com>

European Bioinformatics Institute (EBI, Hinxton, UK): <http://www.ebi.ac.uk>

Human Genome Science (Rockville, MD, USA): <http://www.hsgj.com>

Incyte Genomics (Palo Alto, CA, USA): <http://www.incyte.com>

National Centre for Biotechnology information (NCBI, Bethesda, MD, USA): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Genética y análisis de SNP

DeCode Genetics (Reykjavic, Islandia): <http://www.decode.com>

Genset (Paris, Francia): <http://www.genxy.com>

SNP Consortium: <http://snp.cshl.org>

Genaissance Pharmaceuticals (New Haven, CT, USA): <http://www.genaissance.com>

Perfiles de expresión de ARNm y splicing alternativo

Compugen (Jamesburg NJ, USA): <http://www.cgen.com>

I.M.A.G.E. Consortium (Livermore, CA, USA): <http://image.llnl.gov>

Incyte Genomics (Palo Alto, CA, USA): <http://www.incyte.com>

Rosetta Inpharmatics (Kirkland, WA, USA): <http://www.rii.com>

Affimetrix (Santa Clara, CA, USA): <http://www.affymetrix.com>

GeneLogic (Rockville, MD, USA): <http://www.genelogic.com>

Perfiles de expresión proteómica

Swiss 2D-PAGE: <http://www.expasy.ch/ch2d>

Ciphergen Biosystems (Freemont, CA, USA): <http://www.ciphergen.com>

LSB (Vacaville USA): <http://www.lsb.com>

Estructura de Proteínas

Astex (Cambridge, UK): <http://www.astex-technology.com>

Inpharmatica (London, UK): <http://www.inpharmatica.com>

Integrative Proteomics (Toronto, Canada): <http://www.integrativeproteomics.com>

NIGMS Structural Genomics Initiative (Bethesda, MD, USA): <http://www.nih.gov/nigms/fundingpsi.html>

Protein Data Base (PDB): <http://www.rcsb.org/pdb>

Protein Structure Factory (Berlin, Alemania): <http://www.proteinstrukturfabrik.de>

Prospect Genomics Inc. (San Francisco, CA, USA): <http://www.prospectgenomics.com>

RIKEN (Saitama, Japón): <http://www.riken.go.jp>

Structural Bioinformatics (San Diego, CA, USA): <http://www.strubix.com>

Structural Genomics (San Diego, CA, USA): <http://www.stromix.com>

Syrrix (San Diego, CA, USA): <http://www.syrrix.com>

Interacciones globales Proteína-Proteína

Caprion Proteomics (Montreal, Canada): <http://www.caprion.com>

Curagen (New Haven, CT, USA): <http://www.curagen.com>

Hybrigenics (Paris, Francia): <http://www.hybrigenics.com>

MDS Proteomics (Calgary, Canada): <http://www.mdsintl.com>

Diseño y testeo de drogas a escala industrial

DeNovo Pharmaceutical (Cambridge, UK): <http://www.denovopharma.com>

Prospects Genomics Inc. (San Francisco, CA, USA): <http://www.prospectgenomics.com>

CEREP (Rueil-Malmaison, Francia): <http://www.cerep.fr/Cerep>

Evotec (Hamburgo, Alemania): <http://www.evotec.de>

Neogenesis (Cambridge, MA, USA): <http://www.neogenesis.com>

Proterics (Macclesfield, UK): <http://www.proterics.com>

Fig. 18: Empresas involucradas en el diseño y descubrimiento de drogas (tomado de 108)

La combinación de la genómica, la proteómica y la metabonómica permitirá predecir toxicidades e inferir mecanismos de acción, ya que el uso de una sola de estas tecnologías podría ser insuficiente debido a que muchas drogas y xenobióticos podrían actuar a través de diferentes mecanismos dependiendo de la dosis, el tiempo y la duración de la exposición, así como del tipo de célula o tejido involucrado^{115,116}.

Proteómica

Con la secuenciación del genoma ahora en una etapa industrial, y casi en aplicación de rutina, el interés se ha ampliado a extraer la información codificada en la secuencia de ADN. Sin embargo, programas como el Proyecto Proteoma Humano son más difusos, sin un obvio punto final. Uno podría cuestionar su utilidad, más que nada como un medio de despertar la conciencia pública de que la se-

cuencia genómica sola no logrará la cura de enfermedades. El campo de la proteómica ha emergido con la meta de desarrollar y aplicar métodos para el análisis global de la expresión y funcionalidad proteica. La creación de metodologías efectivas para el análisis rápido y en paralelo de las proteínas podría acelerar el conocimiento de la función de esas biomoléculas y, a través de esto, descubrir nuevos marcadores y blancos terapéuticos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas, y aumentar nuestro conocimiento de la mecánica de los procesos biológicos.

Sin embargo, para enfrentar estos desafíos, los investigadores deben sortear dificultades que habitualmente limitan sus esfuerzos para caracterizar sistemáticamente proteínas de muestras altamente complejas.

- La proteómica no implica solamente los equivalentes proteicos de la genómica, pues además de haber diferencias entre el genoma y las traducciones de los ARNm, exis-

Links generales
 Genomics Proteomics
<http://www.genomicsproteomics.com>
 Lab-on-a-chip
<http://www.lab-on-a-chip.com>
 Bio-IT World
<http://www.bio-itworld.com>
 Pharmacogenomics Online
<http://www.pharmacogenomicsonline.com>
 BioArray Software Environment - BASE
<http://base.thep.lu.se>

Microarrays de ADN
 The Brown Lab, Stanford University
<http://www.cmgm.stanford.edu>
 Affymetrix
<http://www.affymetrix.com>

Microarrays de Proteínas
 ESF Programme on Integrated Approaches for Functional Genomics
http://www.functionalgenomics.org.uk/sections/resources/protein_arrays.htm

Glicómica
 NIGMS Consortium for Functional Glycomics
<http://www.web.mit.edu/glycomics/consortium/>
 Glycominds
<http://www.glycominds.com>
 GlycoSuite DB
<http://proteosystems.com>
 University of New Hampshire Centre for Structural Biology
<http://www.glycomics.unh.edu>
 Oxford Glycobiology Institute list of publications
<http://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/publications.html>

Arrays de tejidos y Microarrays celulares
 NHGRI Tissue Microarray Project
<http://www.nhgri.nih.gov/DIR/CGB/TMA>
 Whitehead Institute
<http://www.wi.mit.edu>

Fig. 19: Links en la web más utilizados en tecnología de microarray (tomado de 118)

ten variados problemas metodológicos que se manifiestan durante las investigaciones científicas de las proteínas. Por ejemplo, a diferencia del ADN y el ARN, las proteínas, aunque pueden ser fácilmente aisladas, no pueden ser amplificadas por métodos análogos a PCR, por lo cual la cantidad de ellas presentes en una muestra dada es la cantidad de proteínas que será analizada. Así, los investigadores de proteómica se enfrentan con la difícil tarea de detectar, identificar y caracterizar numerosos casos de proteínas minoritarias en sus concentraciones celulares naturales, aun cuando los niveles de estas biomoléculas sean 6 a 8 órdenes de magnitud menores que otras muestras de proteínas altamente abundantes en la misma muestra (si es el caso).

- Además, a diferencia del ARN o del ADN, las proteínas no poseen propiamente complementos de unión o hibridación de alta afinidad o selectividad. Así, aunque en el campo de los microarrays génicos los investigadores de microarray de proteínas han sido capaces de capitalizar las interacciones especiales que los oligonucleótidos comparten con sus secuencias complementarias, aún deben desarrollar un agente que reaggre para cada proteína de interés, un proceso que será caro y laborioso, pero de crucial importancia¹⁷.

- Finalmente, las proteínas exhiben un rango de propiedades bioquímicas que exceden ampliamente el relativamen-

te homogéneo comportamiento de los oligonucleótidos, y que es dependiente de la estructura 3D precisa de los polipéptidos plegados. La diversidad de cualidades exhibidas por las proteínas exige un mayor nivel de complejidad de los métodos utilizados para manipularlas y procesarlas.

A pesar de todos los problemas que el estudio de la proteómica ofrece, su desarrollo no puede ser retrasado. La regulación de la expresión a nivel post-trascricional goza de una complejidad exuberante manifestada básicamente por la falta de correlación entre las magnitudes de las concentraciones de ARNm y la abundancia de proteínas, así como las perturbaciones en las cantidades de cada uno. Además, las proteínas son modificadas por un número en aumento de eventos post-traduccionales, algunos de los cuales son dinámicos en naturaleza, subrayando la necesidad de que no solo se detecten, sino también se caractericen desde el proteoma nativo. Es importante reconocer que los eventos fisiológicos y patológicos que constituyen las bases para la salud y la enfermedad son, en el fondo, procesos manejados por proteínas. Para entender esos procesos en sus detalles moleculares debería analizarse el proteoma en todas sus formas de regulación temporal y espacial. Los microarrays de ADNc y ARN para el estudio de la expresión génica, para el filtrado de bibliotecas de proteínas y pequeñas moléculas, pueden ayudar en la caracterización proteómica¹¹⁸ (Figura 19).



- Nociones básicas de algoritmos y complejidad de algoritmos.
- Comparación de secuencias y búsqueda en base de datos.
- Montaje de fragmentos de ADN
- Mapeo físico de cromosomas.
- Árboles filogenéticos.
- Estructura de proteínas, predicción de estructuras.

Analizar marcos de lectura de ADN

Ejemplo: Análisis de LacZ

En el marco de lectura correcto se obtiene en la región del gen.



O: codón óptimo (de mayor uso)
 S: codón subóptimo (segunda posibilidad)
 R: de uso raro o escaso
 U: únicos (incluye los STOPS, el ATG y el TGG)

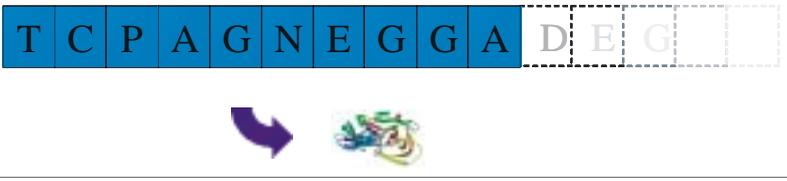


Fig. 20: Áreas de interés de la biología computacional

Biología computacional

El estudio de los genomas de la rata, el perro y el ratón, junto con el descubrimiento de nuevos genes, ha ido de la mano del desarrollo de la biología computacional, una herramienta nueva en el descubrimiento y estudio de nuevos productos farmacéuticos. Ésta posibilita un amplio examen de clases de genes y variaciones de secuencia (polimorfismos), incluyendo los elementos regulatorios que gobiernan la frecuencia y especificidad tisular de la expresión génica.

Blancos de descubrimiento, identificación de componentes primarios, farmacología, bioquímica, toxicología, literatura médica extensa y ensayos clínicos pueden hoy unificarse con la tecnología informática (bioinformática), apareciendo como una poderosa máquina de descubrimientos y desarrollos de nuevas tecnologías y productos (Figura 20)¹¹⁹. Este proceso unificado podría proveer nuevas oportunidades para un diseño más racional de moléculas grandes y pequeñas, e incluso establecer nuevos abordajes en el desarrollo de vacunas contra el cáncer, además de disminuir los efectos colaterales inesperados. Tomados juntos, estos avances permitirán que los científicos preparados en el nuevo mundo de la información y la computación agilicen la identificación de nuevos agentes, eliminando productos que podrían generar toxicidad o pobre eficacia y disminuyan los costos y los riesgos asociados a los paradigmas habituales del descubrimiento y desarrollo de drogas.

Nota del editor: La tercera y última parte de este artículo; Genoma y anestesia, será publicado en el próximo número.

Bibliografía

1. La célula dinámica. En: Lodish H, Berk A, Zipursky SL y col. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Panamericana, 2002 (4a. ed). Buenos Aires, pág. 4.
<http://www.biografiasyvidas.com/biografia/w/watson.htm>.
2. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1962/crick-bio.html>.
3. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953; 171: 737-738.
4. Venter JC, Adams MD, Myers EW. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-1351.
5. International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC). Initial sequencing of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
<http://www.genome.gov/11006929>.
6. Guttmacher A, Collins FS. Wellcome to the genomic era. *NEJM* 2003; 349: 996-998
7. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS y col. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *NEJM* 2003; 348: 1953-1966.
8. Drosten C, Günther S, Preiser W y col. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *NEJM* 2003; 348: 1967-1976.
9. Hoffman E, Krauss S, Perez D y col. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 2002; 20: 3165-3170.
10. Webby RJ, Perez DR, Coleman JS y col. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *The Lancet* 2004; 363: 1099-1103.
11. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ y col. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *NEJM* 2002; 347: 1999-2009.
12. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C y col. Risk stratification in the long QT syndrome. *NEJM* 2003; 348:1866-1874.
13. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S y col. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *NEJM* 2002; 347: 1916-1923.
14. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME y col. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *NEJM* 2003; 348: 1442-1448.
15. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J y col. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *NEJM* 2003; 348: 1201-1214.
16. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *NEJM* 2003; 348: 1085-1095.
17. Branson R, Potoczna N, Kral K-U, Hoehe MR, Horber FF. Binge eatings as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *NEJM* 2003; 348: 1096-2103
18. Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA y col. The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature* 2003; 424: 157-164.
19. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ y col. The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423: 825-837.
20. Broder S, Venter JC. Sequencing the entire genomes of free-living organisms: the foundation of pharmacology in the new millennium. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 97-132.
21. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000; 405: 857-865.
22. Broder S, Venter JC. Genomics, science and medicine: the future is now. *Drug Discovery Today* 2001; 6 (15): S63-S64.
23. Lahana R. Computational approaches in the post-genomic era – how will we cope? *Drug Discovery Today* 2001; 6 (1): 15.
24. Blackstock W, Mann M. A boundless future for proteomics?. *Trends Biotechnol* 2001; 10 (suppl): S1-S2.
25. Bentley D. Life after Human Genome Project. *Drug Discovery Today* 2001; 6 (1): 13-14.
26. Venter C. Life after Human Genome Project. *Drug Discovery Today* 2001; 6 (1): 10-12.
27. Davis BD. Evolución de la microbiología y de los microbios. Cap I. Pág. 1. En: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Tratado de microbiología*. 3ra.ed. Editorial Salvat. Barcelona, 1984.
28. Oparin A. Origen de los organismos primitivos. En: Oparin A. *El origen de la vida*. Pág. 84. 1957. Ediciones Cultura. Buenos Aires.
29. Ácidos nucleicos, código genético y síntesis de macromoléculas. En: Lodish H, Berk A, Zipursky SL y col. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Panamericana, 2002, (4a. ed), Buenos Aires, pág. 101.
30. Estructura molecular de genes y cromosomas. En: Lodish H, Berk A, Zipursky SL y col. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Panamericana, 2002, (4a. ed). Buenos Aires, pág. 295.
31. Dennis C. Small RNAs. The genome's guiding hand?. *Nature* 2002; 240: 732.

34. Ácidos nucleicos, código genético y síntesis de macromoléculas. En: Lodish H, Berk A, Zipursky SL y col. *Biología Celular y Molecular*. Ed. Panamericana, 2002, (4a. ed). Buenos Aires, pág. 111.
35. Bradbury J. Ancient footsteps in our genes: evolution and human disease. *The Lancet* 2004; 363: 952-953.
36. Davis BD. Evolución de la microbiología y de los microbios. Cap I. Pág. 8. En: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Tratado de microbiología*. 3ra.ed. Editorial Salvat. Barcelona, 1984.
37. Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H y col. Astrogliosis and the apoE genotype. An immunohistochemical study of post-mortem human brain tissue. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10: 252-257.
38. Wallace RW. The Human Genome Diversity Project: medical benefits vs. ethical concerns. *Mol Med Today* 1998; 4 (2): 59-62.
39. Cavalli-Sforza LL. The DNA revolution in population genetics. *Trend Genet* 1998; 14: 60-65.
40. Hotzman NA, Watson MS. Promoting safe and effective genetic testing in the United States: final report of the Task Force on Genetic Testing. Baltimore: John Hopkins University Press, 1999. Pág. 59-75.
41. <http://www.geneclinics.org>.
42. Burke W. Genetic Testing. En: Guttmacher AE, Collins FS. *Genomic medicine*. NEJM 2002; 347 (23): 1867-1875.
43. Weisner GL, Snow K. Multiple endocrine neoplasia type 2 [includes: MEN 2A (Sipple syndrome), MEN 2B (mucosal neuroma syndrome), familial medullary thyroid carcinoma (FMTC)]. Seattle: GeneClinics, 1999.
44. Raue F. German medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia registry. *Arch Surg* 1998; 383: 334-336.
45. Kebelew E, Ituarte PH, Siperstein AE y col. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognosis factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000; 88: 1139-1148.
46. Blake DJ, Weir A, Newey SE y col. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002; 82: 291-329.
47. Grody WW. Cystic fibrosis: molecular diagnosis, population screening, and public policy. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1041-1046.
48. Brody LC, Biesecker BB. Breast cancer susceptibility genes: BRCA1 y BRCA2. *Medicine (Baltimore)* 1998; 77: 208-226.
49. Cao A, Galanello R, Rositelli MC. Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies. *Ballieres Clin Haematol* 1998; 11: 215-238.
50. Crow JF. Two centuries of genetics: a view from halftime. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 21-40.
51. Capone GT. Down syndrome: advances in molecular biology and the neurosciences. *J Dev Behav Pediatr* 2001; 22: 40-59.
52. Wald NJ, Hackshaw AK. Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Ballieres best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 563-580.
53. Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S. Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 2001; 86: 283-287.
54. Robinson R, Curran JL, Hall WJ y col. Genetic heterogeneity and HOMOG analysis in British malignant hyperthermia families. *J Med Genet* 1998; 35: 196-201.
55. Sambughin N, Sei Y, Gallagher KL y col. North American malignant hyperthermia population: screening of the ryanodine receptor gene and identification of novel mutations. *Anesthesiology* 2001; 95: 594-599.
56. Ruelfert H, Olthoff D, Deutrich C y col. Homozygous and heterozygous Arg614Cys mutations (1840CàT) in the ryanodine receptor gene co-segregate with malignant hyperthermia susceptibility in a German family. *Br J Anaesth* 2001; 87: 240-245.
57. Girard T, Urwyler A, Censier K y col. Genotype-phenotype comparison of the Swiss malignant hyperthermia population. *Hum Mutat* 2001; 18: 357-358.
58. McCarthy TV, Quane KA, Lynch PJ. Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* 2000; 15: 410-417.
59. Barone V, Massa O, Intravaia E y col. Mutation screening of the RYR1 gene and identification of two novel mutations in Italian malignant hyperthermia families. *J Med Genet* 1999; 36: 115-118.
60. Robinson RL, Anetseder MJ, Brancadoro V y col. Recent advances in the diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility: how confident can we be of the genetic testing? *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 342-348.
61. <http://www.diariomedico.com/ultimas/not270600i.html>.
62. <http://www.venterscience.org/nws.html>.
63. Vogel F. Moderne problem der Humangenetik. *Ergib Inn Kinderheild* 1959; 12: 52-125.
64. Weber WW. Pharmacogenetic concepts. En: *Pharmacogenetics*. 1997. Oxford University Press. Pág. 2.
65. Shastry BS. SNPs and haplotypes: genetic markers for disease and drug response (review). *Int J Mol Med*. 2003; 11 (3): 379-82.
66. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients. *JAMA*. 1998; 279: 1200-1205.
67. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *A Trends Guide Variation and Genome Medicine* 2002; Suppl: S43-S47.
68. Mancinelli L, Cronin M, Sadee W. Pharmacogenomics: The Promise of Personalized Medicine. *AAPS Pharm Sci*. 2000; 2 (1): 1208-1225.
69. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A: Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 1997; 278:1580-1581.
70. Collins FS, Mansoura MK. The Human Genome Project. Revealing the shared inheritance of all humankind. *Cancer* 2001; 91 (1 Suppl): 221-225
71. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-186.
72. McCarthy JJ, Hilfiker R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 505-508.
73. Wang DG. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280: 1077-1082.
74. Schafer AJ, Hawkins JR. DNA variations and the future of human genetics. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 33-39.
75. Landegren U y col. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 1998; 8: 769-776.
76. Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet*. 2002;47(11):605-10.

77. Carlson CS, Newman TL, Nickerson DA. SNPing in the human genome. A trends guide to genetic variation and genomic medicine 2002; Suppl : S2-S8.
78. Jazwinska EC. Exploiting human genetic variation in drug discovery and development. A Trends Guide to genetic variation and genomic medicine 2002, Suppl: S30-S36.
79. Lida A, Saito S, Sekine A, Nakamura Y. SNP collection, pharmacogenomics, and the future of drug therapy. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2002; 29 (9): 1665-1673.
80. Krugliak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 1998; 17: 21-24.
81. Collins FS y col. New goals for the US Human Genome Project: 1998-2003. *Science* 1998; 282: 682-689.
82. McCarthy JJ, Hilfiker R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat Biotechnol*. 2000; 18 (5): 505-508.
83. Griffin TJ, Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. A trends guide to genetic variation and genomic medicine 2002; Suppl : S10-S18.
84. Ramsay G. DNA chips: state-of-the-art. *Nat Biotechnol* 1998; 16, 40-44.
85. Nollau P and Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem* 1997; 43: 1114-1128.
86. Fu D y col. Secuencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 381-384.
87. Kirpekar F y col. 1998; DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2554-2559.
88. Ross PL y col. Analysis of DNA fragments from conventional and microfabricated PCR devices using delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 1998; 70: 2067-2073.
89. Taranenko NI y col. Laser desorption mass spectrometry for point mutation detection. *Genet Anal Biomol Eng* 1996; 13: 87-94.
90. Jurinke C y col. Analysis of ligase chain reaction products via matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 1996; 237: 174-181.
91. Liu Y-H y col. Rapid screening of genetic polymorphisms using buccal cell DNA with detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995; 9: 735-743.
92. Srinivasan JR y col. Genotyping of apolipoprotein E by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995; 12: 1045-1050.
93. Haff LA, Smirnov IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 1997; 7: 378-388.
94. Fei Z y col. MALDI-TOF mass spectrometric typing of single nucleotide polymorphisms with mass-tagged ddNTPs. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2827-2828
95. Ross P y col. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 1347-1351.
96. Griffin TJ y col. Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 1368-1372.
97. Ross PL y col. Discrimination of single nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; 69: 4197-4202.
98. Jiang Baucom P y col. DNA typing of human leukocyte antigen sequence polymorphisms by peptide nucleic acid probes and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; 69: 4894-4898.
99. Griffin TJ y col. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6301-6306.
100. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, The International SNP Map Working Group: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001, 409: 928-933.
101. Nakamura Y. Impact of human genome analysis on the future medicine. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1999; 114 (3): 126-130.
102. Bashyam MD, Hasnain SE. The human genome sequence: impact on health care. *Indian J Med Res*. 2003; 117: 43-65.
103. Bottles K. A revolution in genetics: changing medicine, changing lives. *Physician Exec*. 2001; 27 (2): 58-63.
104. Halushka MK y col. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 1999; 22: 239-247.
105. M. Ingelman-Sundberg. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *Journal of Internal Medicine* 2001; 250 (3): 186-193.
106. Nebert DW, Jorge-Nebert L, Vesell ES. Pharmacogenomics and "individualized drug therapy": high expectations and disappointing achievements. *Am J Pharmacogenomics*. 2003; 3(6): 361-370.
107. Sadee W. Finding the right drug for the right patient. *Pharm Res*. 1998; 15:959-963.
108. Dean PM, Zanders ED, Bailey DS. Industrial-scale, genomics-based drug design and discovery. A trends Guide to Genetic Variation and Genomic Medicine 2002; Suppl S37-S42.
109. Bolaños E. Comunicación personal. Buenos Aires, junio de 2004.
110. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Therapeut*. 1999; 21: 309-318.
111. Baselge J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (HERCEPTIN) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 1998; 58: 2825-2831.
112. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980; 32: 651-662.
113. Tai H, Krynetski EY, Yates CR y col. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet*. 1996; 58:694-702.
114. Olden K. New opportunities in toxicology in the post-genomic era. *Drug Discovery Today* 2002; 7 (5): 273-274.
115. Olden K, Guthrie J. Genomics: implications for toxicology.

- Mutant Res 2001; 473: 3-10.
116. Olden K, Wilson S. Environmental health and genomics: visions and implications. Nat Rev Genet 2000; 1: 149-153.
117. Aebersold R, Cravatt BF. Proteomics-advances, applications and the challenge that remain. Trends in Biotech 2002; 20 (12): S1-S2.
118. Howbrook D, van der Valk A, O'Shaughnessy M y col. Developments in microarray technologies. Drug Discovery Today 2003; 8 (14): 642-651.
119. Terfloth L, Gasteiner J. Neural networks and genetic algorithms in drug design. Drug Discovery Today 6 (15): (Suppl) S 102-S108.

Aceptado: 11/12/04

Dirección postal: Dr. Barbieri Pedro
E-mail: pbarbieri@arnet.com.ar
Dirección postal: Dra. Moya Graciela
E-mail: graciela.moya@tutopia.com.ar