

Actualización Médica Periódica

Número 46

www.ampmd.com

Marzo 2005

ARTICULO DE REVISION

Dr. Orlando Quesada Vargas

GENOMICA Y LA TERAPIA GENICA

VISION PRACTICA POR UN INTERNISTA

Introducción

La genómica ha introducido una nueva dimensión a la investigación de las ciencias biológicas, incluyendo desde luego a la medicina. Se ha tornado en la disciplina central de donde nacerá la nueva taxonomía molecular que va a reclasificar a todas las enfermedades. Será conveniente aclarar que no es el estudio de los genes aislados sino que comprende a la vez la función e interacción de los mismos en el genoma.

Podría considerarse como la fecha de nacimiento de la genómica el día 14 de abril del año 2003, cuando se terminó la secuencia de más de 3.1 gigabases de ADN que componen el genoma humano involucrando a más de 3 billones de pares de bases nitrogenadas y que representan los aproximadamente los 35,000 genes que

codifican por más de 100,000 diferentes proteínas.

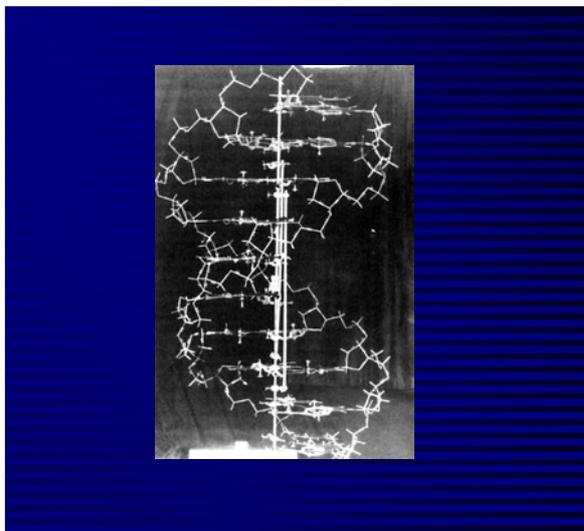
De todas estas estructuras y sus derivados, principalmente los proteicos, habrá que estudiar la interrelación desde el punto de vista funcional que estos diferentes compuestos mantienen entre sí y que permitirán explicar a nivel molecular los mecanismos de homeostasis y la ruptura de los mismos en las diversas enfermedades. Probablemente permitirá a la generación actual acercarse a la comprensión del origen de la vida y quizás a poder predecir el futuro de la evolución. Ninguna se había acercado a un principio básico tan trascendental como el que dio origen a la identificación de los mecanismos de transmisión del código genético (1,2).

La literatura involucrada con la explosión de esta disciplina en los últimos veinte años es

sencillamente abrumadora y por lo tanto, sujeta a que un practicante clínico pueda extraer solo algunas pinceladas de esta información tan extensa, compleja y a su vez sencillamente extraordinaria. Pero como decía Louis Pasteur, tendremos que hacer un esfuerzo en la medida de lo posible para tratar de hacer una síntesis y tener una orientación básica. La frase de Pasteur aplicable a lo que sería la introducción de la genómica en la medicina actual, se transcribe dada la vigencia que la misma ha adquirido: "para aquel que dedica su vida a la ciencia, nada le brindará mayor felicidad que el aumentar el número de sus descubrimientos, pero la copa de la alegría estará llena cuando los resultados de sus estudios encuentren de inmediato, aplicaciones prácticas".

La *Figura 1*, ilustra el esquema de la presentación del modelo de la doble hélice del ADN presentado hace 52 años por James Watson y Francis Crick. Esta estructura sorprendió a todo el mundo científico y uno de los historiadores de la época lo llamó "la gran sorpresa para todos" (4). Por supuesto, la comprensión e impacto que este descubrimiento ocasionó tiene que ser analizado a la luz de los antecedentes que precedieron su presentación.

Figura 1



Adaptada de (3)

46-03-05-AR

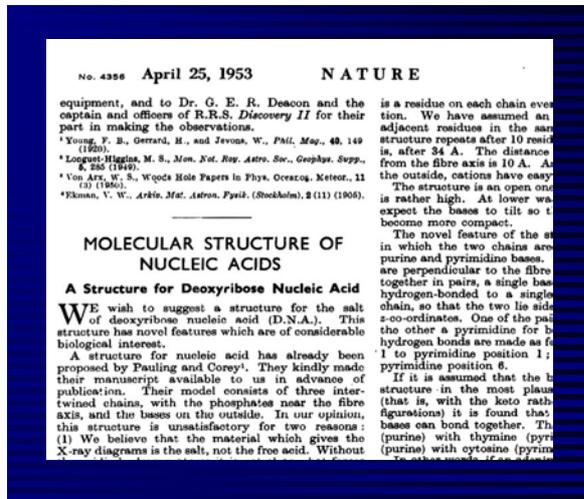
Nadie, absolutamente nadie, hasta el día de la publicación había pensado que la especificidad del código genético estaba contenida en una estructura tan sencilla.

El contexto global del desarrollo científico del proyecto tendría que dirigirse en retrospecto a descubrimientos fundamentales llevados a cabo a principios de ese siglo, especialmente el invento de la cristalografía por rayos X realizado por William L. Bragg, quien específicamente en 1912, sentaba las bases que permitían identificar las estructuras de moléculas a pesar de su gran tamaño y complejidad, y consolidaba así la transición de un mundo eminentemente físico hacia uno orientado a la química. Y es que el auge de esta ciencia, especialmente de la bioquímica, era impresionante incluyendo los estudios en relación con las enzimas, los cuales consiguieron la atención de los principales investigadores; igualmente otras proteínas como los anticuerpos, las hormonas y diversos componentes del aparato inmunológico atraían a los científicos. Se presumía que el material genético era de naturaleza química.

La publicación que apareció como una carta, impresionante por su sencillez, claridad y profundidad, en la revista *Nature*, el día 25 de abril de 1953 es la que se ilustra en la *Figura 2*. Watson y Crick comunicaban así su astuta observación a la comunidad científica internacional. Pocas semanas antes, Maurice Wilkins le había mostrado algunas "fotografías" realizadas a través del método de difracción de los rayos X, en las que parecían definirse las características fundamentales de la doble hélice que componían al ADN. A propósito de difracción por rayos X este fue uno de los elementos fundamentales en el contexto científico que precedió al descubrimiento y fue producto de la tenacidad y la extraordinaria capacidad de otra investigadora, Rosalind Franklin (4).

Como menciona Judson en su artículo (4), existe un número significativo de personajes a los cuales se les ha omitido la premiación correspondiente, incluyendo el

Figura 2



Adaptada de 3

Nobel en Medicina. Uno de ellos fue el bacteriólogo Oswald Avery, del Instituto Rockefeller en Nueva York quien a través de más de dos décadas de experimentos con *Pneumococcus*, pudo aislar e identificar lo que él llamó el “principio de transformación”. Esta sustancia extraída de una variedad específica de *Pneumococcus*, podía cuando se incubaba en medios de cultivo transcribir a otras cepas de variedades completamente distintas, las características de la primera y a las siguientes generaciones. El postuló que este material transformante no era proteína sino ADN y así lo comunicó en una carta famosa a su hermano, quien también era un investigador y trabajaba en la Universidad de Vanderbilt. Avery especuló que los genes podrían estar conformados por ADN. Gran parte de la concepción final del diseño de la molécula pudo plasmarse a través de los trabajos pioneros en los diversos campos que los dos investigadores pudieron haberse sensibilizado de sus correspondientes mentores. Específicamente, y ya en Cambridge, Crick había estado expuesto a los métodos de cromatografía en la identificación de diversas proteínas incluyendo la secuencia de la insulina y probablemente la relación de las diferentes bases en la molécula de ADN había sido

46-03-05-AR

diseñada por Sanger y Chargoff.

De una manera u otra los autores de esta astuta concepción científica señalaron veinte años después de su descubrimiento, que la molécula tenía estilo y clase. Ellos comentaron que lo básico había sido diseñar como las dos cadenas de hélices se mantenían juntas a través de las cuatro bases y sus respectivas relaciones de adenina, timina, guanina y citosina. Así mismo, que los radicales fosfato irían por el “exterior” de la molécula y las bases nitrogenadas en la porción interior.

Aplicaciones

Algunas aplicaciones de la genómica a la práctica clínica, se ilustran en el Cuadro 1 y en el se brindan algunos ejemplos de esas iniciativas en el ejercicio diario de la medicina. Nótese como desde el punto de vista diagnóstico, el mismo se ha orientado a la identificación de diversos desórdenes a nivel prenatal, al diagnóstico de las enfermedades monogénicas y de manera muy prominente al desarrollo de métodos diagnósticos, como por ejemplo el desarrollo de la reacción de la polimerasa en cadena, uno de los descubrimientos más importantes

Cuadro 1

GENOMICA	
ALGUNAS APLICACIONES	
CONDICION	EJEMPLO
- Diagnóstico prenatal	Tay Sachs
- Escrutinio	Hamocromatosis
- Escrutinio condiciones alto riesgo	Síndrome QT largo
- Diagnóstico enfermedad monogénica	Fibrosis quística
- Identificación nuevos patógenos	SARS
- Farmacogenómica	6 mercaptopurina
- Vacunas	ADN
- Terapia	Oncología
- Métodos diagnóstico	PCR
- Enfermedades comunes multifactoriales	DM – HTA – obesidad

de la medicina en los últimos veinte años. A través de ella se consigue amplificar pequeños segmentos de ADN o RNA mensajero en una magnitud considerable, lo cual ha revolucionado el diagnóstico de muchas enfermedades especialmente de origen infeccioso o inmunológico. En ese cuadro, se incluye la mayor parte de los apartados que abarcaré en este artículo incluyendo los métodos de escrutinio, las aplicaciones de la farmacogenómica, el potencial de nuevas modalidades terapéuticas, así como en la implicación potencial en las enfermedades comunes de origen multifactorial y que hoy en día nos agobian, como son la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la obesidad (21).

En relación a las últimas entidades señaladas, el rol potencial de la genómica se ha visto limitado pues es un hecho que las mismas obedecen a mecanismos fisiopatológicos sumamente complejos, en los que intervienen múltiples genes sumados a una marcada influencia ambiental. Los genes involucrados podrían tener acciones diametralmente opuestas entre promotores y/o “protectores” de la salud, o comportarse de manera patológica para contribuir a la enfermedad. En otras palabras los genes que en realidad representan “recetas” para elaborar productos fundamentalmente proteicos, podrán contribuir en las diversas enfermedades por la carencia de un compuesto necesario o por la sumación de un producto deletéreo. La comprensión fisiopatológica de las enfermedades multifactoriales requerirá de la elaboración de verdaderos mapas de haplotipos, entendiéndose por los últimos grupos de alelos que se heredan en conjunto dentro del genoma (alelos son formas alternativas de genes) para poder identificar aquellas zonas comprometidas en diversas regiones del genoma y que pudieran co-relacionarse con los estudios clínicos fundamentalmente los que se llevan a cabo a nivel epidemiológico. De esta manera, se podría en grandes grupos de poblaciones identificar las zonas (del genoma) que predisponen junto con los factores ambientales a enfermedades tales

46-03-05-AR

como la diabetes o la hipertensión arterial o en sentido inverso, aquellas zonas o grupos de alelos en los diferentes cromosomas que están presentes en personas completamente sanas y que consiguen una longevidad significativa. A pesar de todo lo anterior y aún identificando los mecanismos poligénicos envueltos en esas enfermedades, los mismos tendrán una limitación o dependerán de muchas variables incluyendo además de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas, la prevalencia misma de la enfermedad en las respectivas comunidades. Así por ejemplo, la identificación de un haplotipo que tenga una alta sensibilidad cercana a un 60 a 70% podría tener un valor positivo de predicción de solamente un 15% si la prevalencia de la enfermedad fuera como lo es la hipertensión arterial de un 20 a un 22% en la población general.

Con lo mencionado anteriormente, el desarrollo de “chips” que determinarían los genotipos susceptibles y la posibilidad de predecir el futuro de la salud de un individuo en relación con las enfermedades más frecuentes es improbable, en el entendido de que las mismas involucran mecanismos sumamente complejos que no sería puesto en práctica de en el futuro cercano (1).

La *Tabla 2*, resume los principios básicos que el método de escrutinio tendría dentro del campo de la genómica y su aplicación a la práctica clínica y el cual es tomado de una revisión reciente del Dr. Khoury (5). Se señala que el método de escrutinio en general está destinado a la identificación de problemas a los cuales se tenga alguna solución potencial desde el punto de vista terapéutico o al menos algún grado de posibilidad de interferir con su historia natural que conlleva hacia un curso negativo en la salud de un individuo. Se preferirá por supuesto condiciones que dentro de la salud pública representen un problema significativo y que el escrutinio se lleve a cabo una vez conocida a plenitud la historia natural del proceso. Los exámenes empleados deberán ser, por supuesto, inocuos pero a su vez muy efectivos para poder establecer sus valores

4

positivos y negativos de predicción. En sus políticas de implementación sobresale el hecho de que las ventajas de los mismos han emergido a través de evidencias científicas, las cuales han conseguido identificar los blancos de población propicios para llevar a cabo los procedimientos respectivos así como las medidas complementarias que se derivarán del mismo, en el sentido de la prevención, el tratamiento y la educación. Estos procedimientos idealmente deberían estar accesibles y llevarse a cabo después de un estricto proceso en la obtención de los consentimientos informados.

Tabla 2

GENOMICA	
ESCRUTINIO – PRINCIPIOS PARA APLICACION	
a)	Salud pública
•	Condición o enfermedad representa un problema de salud pública
•	Prevalencia e impacto son conocidos
•	Se entiende todo el espectro de la historia natural del proceso
b)	Exámenes empleados
•	VPP – VNP conocidos/prueba/enfermedad y la población bajo escrutinio
•	Seguridad y efectividad establecidas
c)	Política para su implementación
•	Ventajas del escrutinio provienen de evidencias científicas
•	Identificar población propicia
•	Complementarse con seguimiento, prevención, tratamiento, educación y soporte social
•	Proceso continuo con retroalimentación de resultados
•	Establecer costos/efectividad
•	Accesibles
•	Consentimiento informado

Adaptada de: N Engl J Med 2003; 348:55

A pesar de lo anterior, los métodos de escrutinio están lejos de representar medidas simples en el ejercicio de la medicina. Por ejemplo, si el mismo lo llevamos a cabo aplicado a la hemocromatosis hereditaria, entidad que quizás represente la enfermedad de mayor impacto desde el punto de vista de su prevalencia dentro de la población general, ya que afecta 1 de cada 300 personas, aún se debate si el método de escrutinio buscando la mutación del gen HFE es válido. La duda nace porque la identificación del defecto genético no necesariamente puede predecir el fenotipo, el cual parece estar influenciado por diversos

46-03-05-AR

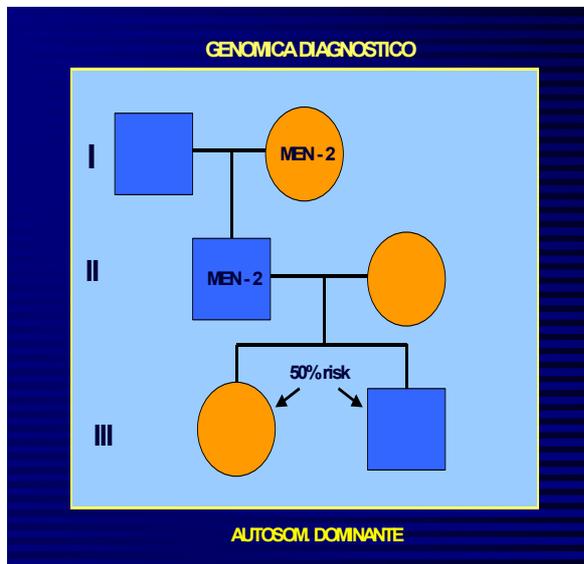
factores ambientales incluyendo agentes hepatotóxicos, especialmente el etanol. De las dos mutaciones que podrían identificarse, la mutación C282G es la más severa y responsable del acúmulo de hierro al cabo de los años, con la aparición subsecuente de cirrosis hepática, diabetes mellitus, cardiomiopatía así como poliartritis, muy semejante a la artritis reumatoidea (5).

Otro ejemplo de los métodos de escrutinio lo representa la identificación de la mutante en el factor V de la coagulación o factor de Leiden. La mutación del mismo altera la conversión normal de protrombina en trombina, lo que condiciona la aparición de un estado trombofílico. Este defecto tiene una distribución sumamente heterogénea en las diversas poblaciones en el mundo, notándose una prevalencia significativamente mayor en los países al norte de Europa, donde alcanza una cifra de un 5 a 7% de individuos heterocigotos. La misma está prácticamente ausente en el Oriente y en el continente africano. ¿Cuál sería la aplicación práctica? Básicamente, la identificación de individuos en riesgo a desarrollar trombosis venosa profunda, el cual se ha estimado que ocurre 8 veces más en pacientes portadores de este defecto en relación con poblaciones controles. El riesgo anual de un individuo heterocigoto, oscilaría entre 0.1 a 0.6 para representar uno global a través de su vida de un 12 a 30%. Es necesario señalar de nuevo, la influencia del ambiente en el entendido de que estos eventos se asocian a factores de riesgo adquiridos incluyendo el estado pos-quirúrgico, el empleo de anticonceptivos y la inmovilidad física.

Si las implicaciones de la genómica con el escrutinio deben contar con alguna aplicación potencial, con mucho más razón aquellas destinadas al diagnóstico *per se* de las diversas entidades hereditarias. Lo anterior, sienta el terreno propicio para recordar algunos ejemplos en relación a los diferentes mecanismos por medio de los cuales la genómica influye en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias. En la *Figura 3*, se consigna un ejemplo de un desorden

autosómico dominante, en este caso el síndrome de neoplasia endocrinológica múltiple tipo II (MEN-II) en el cual se observa como una mujer afectada ha transmitido su enfermedad a uno de sus hijos y como en el pedigree, los hijos de esta última persona tendrían un 50% de riesgo de ser portadores de este trastorno. La aplicación práctica estribaría en el hecho de que con el conocimiento de que un sujeto es portador del defecto, el practicarle una tiroidectomía profiláctica evitaría el desarrollo de un carcinoma medular de tiroides.

Figura 3

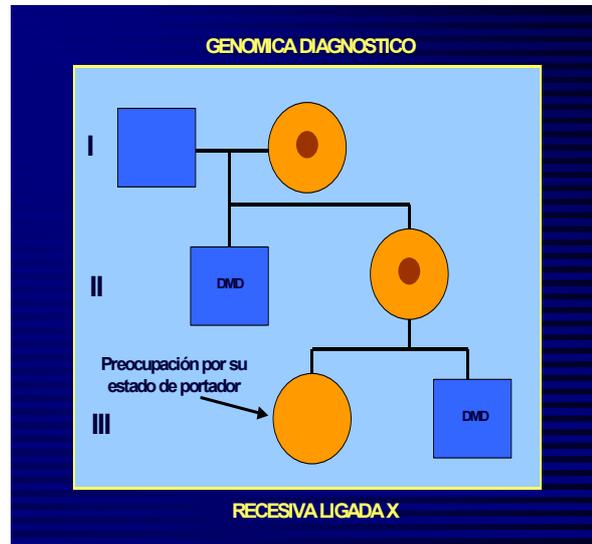


Adaptada de 5

En la *Figura 4*, se ejemplifica un trastorno recesivo ligado al cromosoma X, en este caso una distrofia muscular de Duchenne. El propósito de la metodología diagnóstica en este tipo de enfermedades es fundamentalmente aquel orientado a la identificación de los portadores. En el caso concreto y con el pedigree que se ilustra, la mujer portadora ha transmitido su enfermedad a uno de sus hijos y la hija portadora del desorden, lo ha transmitido a su hijo varón pero existe la incertidumbre, con el señalamiento de la flecha correspondiente si esa mujer es o no

46-03-05-AR

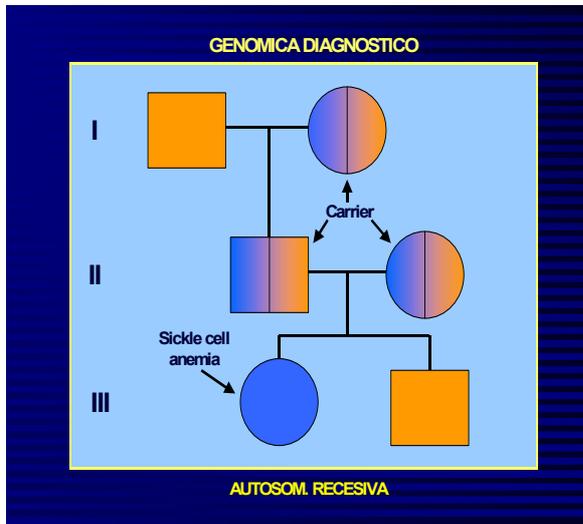
Figura 4



Adaptada de 5

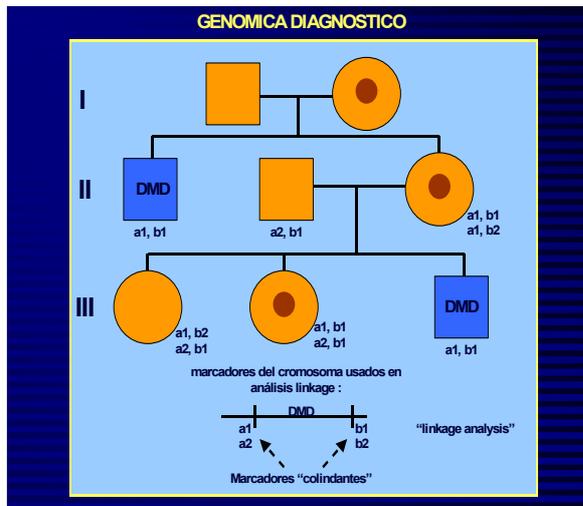
portadora del defecto. En la *Figura 5*, se consigna una aplicación diagnóstica relacionada a las enfermedades heredadas a través de un mecanismo recesivo y autosómico, en la que nuevamente el objetivo fundamental es la identificación de los portadores. Ejemplo de este caso podrían ser los pacientes en riesgo de fibrosis quística o drepanocitosis. Los últimos sujetos en el pedigree tendrían un 67% de posibilidades de ser afectados cuando sus padres se han identificado como portadores del defecto. En la *Figura 6*, se ilustra la metodología conocida en el lenguaje genético como "linkage" análisis, aplicable a individuos portadores de una enfermedad en quienes no se identifica una mutación sino que la misma llega a consignarse a través del estudio de la asociación de alelos en *locus vecinos*, para poder identificar a los marcadores respectivos, en el ejemplo que se ilustra una distrofia muscular y que corresponderían a regiones variables de ADN en cualquiera de los segmentos del gen α_1 α_2 b_1 b_2 . Este tipo de identificación probablemente será aplicado a muchas de las enfermedades multifactoriales convencionales.

Figura 5



Adaptada de 5

Figura 6



Adaptada de

Un resumen de las pruebas diagnósticas aplicables a través de la genómica, se presenta en el Cuadro 3, resaltando el hecho de que muchas pruebas genéticas en los ejemplos que se consignan, pueden llevarse a cabo a través de otras metodologías. Así por ejemplo los pacientes con el síndrome de MEN-II se pueden identificar a través de las 46-03-05-AR

determinaciones respectivas de calcitonina, los pacientes distróficos por medio de la medición cuantitativa a nivel inmunohistoquímico en las muestras de músculo esquelético, la electroforesis de hemoglobina en algunas hemoglobinopatías y clásicamente hemos empleado la determinación de electrolitos especialmente cloruros en sudor para la identificación de la fibrosis quística. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estas pruebas es inferior al compararla con las pruebas genéticas.

Cuadro 3

GENOMICA PRUEBAS DIAGNOSTICAS		
Ejemplo	Prueba genética	Otras
MEN2	Mutaciones del gen RET	Moleculares, hormonales
DM Duchenne	Alteraciones del gen distrofina	Medición cuantitativa, inmunohistoquímica
Drepanocitosis	Mutación Hbs	Electroforesis
Fibrosis quística	CFTR mutaciones (25)	Cl - sudor
Down	Trisomía; citogenética	Fenotipo
22q ¹¹ deletion	Hibridación <i>in situ</i>	Fenotipo
Hemocromatosis	Mutaciones gen HFE	Fe s - CFe - Ferritina - cuantitativo - Bx
TVP	Mutación Factor V	Resistencia a Proteína C activada
Cáncer mama u ovario	Mutaciones ? - BRAC-1 - BRAC-2 - Análisis secuencial ADN	Indicador de riesgo

? "heterogeneidad alélica"; múltiples mutaciones en el mismo gen
 Validez: sensibilidad de la prueba, VPP, grado de expresión (penetrance)
 Adaptada de N Engl J Med 2002; 347:1869, Burke, W

El escenario clínico donde se emplearán las diversas pruebas diagnósticas se ilustra en el Cuadro 4, resaltándose aquellas entidades que tienen actualmente una aplicación prominente a nivel del diagnóstico prenatal, de su capacidad de predicción y de manera importante aquellas que deberían de realizarse a nivel de las diferentes clínicas en que se hace escrutinio a los niños recién nacidos. El tamizaje orientado a la identificación oportuna de enfermedades que conduzcan a retardo mental es de extraordinaria importancia e incluye además de la galactosemia que se señala en el cuadro a la fenilcetonuria, el hipotiroidismo, diversas hemoglobinopatías, la enfermedad

del sirope de maple, la hemocistinuria, las variantes de hiperplasia adrenal y la fibrosis quística.

Cuadro 4

GENOMICA PRUEBAS DIAGNOSTICAS		
TESTS GENETICO - MOLECULARES		
Ejemplos	Genes	Usos
• Alzheimer precoz familiar	PSEN - 1 PSEN - 2	DX, predicción
• Huntington	HD	DX, predic, prenatal
• Marfan	FBNI	DX, prenatal
• Poliposis múltiple adenomatosa familiar	APC	DX, predic.
• β talasemia	B globina	Portador, prenatal
• Hemofilia A	F8C	Pronóstico, portador, prenatal
• Hemofilia B	F9C	Portador, prenatal
• Poliquistosis renal	PKD1-2 PKHD1	Predic - prenatal
• Galactosemia	GALT	Escrutinio RN, portador, prenatal

Adaptada de Burke, W
N Engl J Med 2002; 347:1870

Gene Tests (<http://www.genoclinics.org>)

Precaución

Una nota de cautela es necesario señalar antes de abordar algunas aplicaciones terapéuticas de la genómica.

Durante los últimos cinco años, entre las publicaciones de mayor impacto dentro de la literatura que relaciona a la genómica y su aplicación a la práctica clínica, fueron las que describen la transcripción de un gen que pudiese corregir el temible síndrome de la inmunodeficiencia combinada. Dos grupos trabajando en este campo, lograron a través de la transferencia transgénica y utilizando un vector viral del tipo retrovirus dirigido al receptor de la interleucina II aportar el gen γC que corregía el defecto inmunológico globalmente (6).

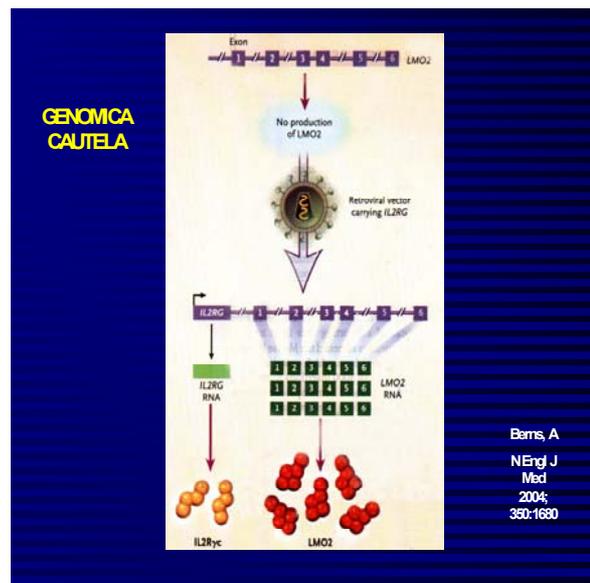
Poco tiempo después, dos de los diez niños originalmente tratados por el grupo parisiense, presentaban un tipo de leucemia de células T. La *Figura 7*, presenta el

46-03-05-AR

mecanismo probable involucrado en esta complicación potencial, cual fue que el gen "inertado" logró por diversas razones incorporarse en una región muy vecina de un oncogen, lo cual sirvió para formar una asociación promotora de una línea celular que contribuía al fenómeno neoplásico. Es decir, existía una verdadera colaboración de dos oncogenes para terminar con la activación de la línea LMO2 como se señala en la figura y aparición del clon celular respectivo.

Una comunicación reciente permite mantener algún grado de alivio pues se consigna que el resto de los niños que han recibido esta terapia afortunadamente permanecen saludables (7,8).

Figura 7



Vectores

En la terapia génica se han utilizado numerosos vectores que tienen como finalidad "transportar" el material genético que se desea suministrar; para reemplazar, aumentar o bloquear determinadas funciones. Los mayormente empleados han

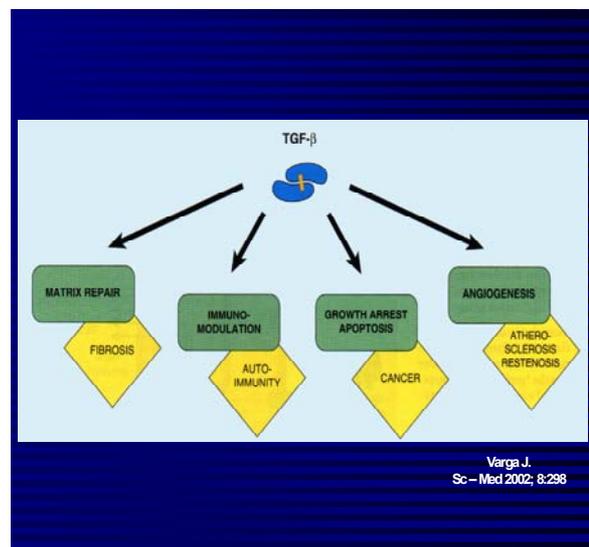
sido algunos serotipos de los adenovirus, fundamentalmente debido a su baja patogenicidad e inmunogenicidad así como su capacidad para conseguir una expresión transgénica a largo plazo dentro del genoma al que se le suministra. A su vez el mismo tiene afinidad por múltiples receptores, especialmente aquellos ligados al factor de crecimiento de fibroblastos y puede incorporarse a células tanto en reposo como aquellas en división activa. Estos serotipos virales consisten en bandas únicas de ADN que codifican a varias proteínas y que a su vez en sus sectores terminales conllevan el potencial de replicación e integración vía endosómica al núcleo celular (9).

TGF-β

El factor transformante de crecimiento o TGF-β que se ilustra en la *Figura 8*, será un blanco especial de la terapia génica, pues esta molécula está involucrada en los mecanismos básicos de homeostasia así como en la génesis de diversas entidades nosológicas. Como se señala esquemáticamente en la figura, esta citosina multifuncional participa en los procesos normales de reparación y cicatrización pero a la vez es el agente fundamental promotor de fibrosis involucrado en la matriz extracelular en prácticamente todos los órganos y quizás sea el responsable del mecanismo básico de entidades tan frecuentes como la fibrosis pulmonar, la cirrosis hepática, las glomeruloesclerosis, etc. Por otro lado es un inmunomodulante fundamental que se involucra en los mecanismos básicos de defensa pero que a su vez está comprometido en trastornos autoinmunes, como se ejemplifica su participación en la esclerosis sistémica progresiva, enfermedad caracterizada por un proceso ilimitado de fibrosis y proliferación en diversos territorios. Este factor es un regulador fundamental del crecimiento y a la vez del mecanismo de apoptosis celular; podría estar involucrado en la génesis del cáncer, específicamente en carcinoma de colon donde mutaciones del mismo han sido ya reportadas. Finalmente, el

46-03-05-AR

Figura 8



Adaptada de 10

mismo es un elemento trascendental en los mecanismos de angiogénesis, es decir, en la promoción de la circulación colateral protectora pero a la vez es un determinante fundamental en los procesos de re-estenosis y en la misma aterosclerosis. Este factor trascendental en la homeostasis, tiene numerosos receptores en diversas poblaciones celulares incluyendo los fibroblastos, las células endoteliales y aquellas que participan en los mecanismos inflamatorios. Funciona a través de diversos segundos mensajeros incluyendo de manera prominente, los actualmente reconocidos como Smads (10).

Oncología

No ha sorprendido por el impacto, que las enfermedades oncológicas representan a las diversas poblaciones que gran parte de la terapia génica potencial haya sido enfocada a este campo. En ese sentido, se han identificado una serie de genes normalmente supresores de tumores que participan activamente en la regulación de los diversos procesos de división celular y en la inducción del fenómeno de apoptosis. Estos genes

protectores se heredan de manera recesiva, es decir, requieren de dos alelos diferentes y el más importante de ellos es el P53 involucrado en la importante función de reconocer los daños iniciales en la molécula de ADN y evitar que los mismos se trasmitan a sus células progenitoras. Su actividad puede alterarse a través de la acción de oncoproteínas virales. Se piensa que trastornos del gen P53 se involucran en al menos la mitad de las neoplasias y la terapia estaría orientada a una reestructuración y fomentar su función. Con ese fin, han sido empleados como vectores los adenovirus y el enfoque inicial ha sido desde el punto de vista estratégico dirigido hacia aquellos tumores que por su localización anatómica requieren de una disminución de la masa tumoral como serían aquellos localizados en el sistema nervioso central o en órganos vitales como podría ser la vejiga urinaria en la unión uretero-vesical. La aplicación del gen P53 se ha llevado a cabo en estudios fase II y III, asociados a otras terapias incluyendo la quimioterapia y la radioterapia (11).

Específicamente para los tumores de cabeza y cuello, la administración del P53 a través de sus diferentes vectores ha conseguido un mayor efecto cuando el mismo ha sido precedido por la administración de quimioterapia (11).

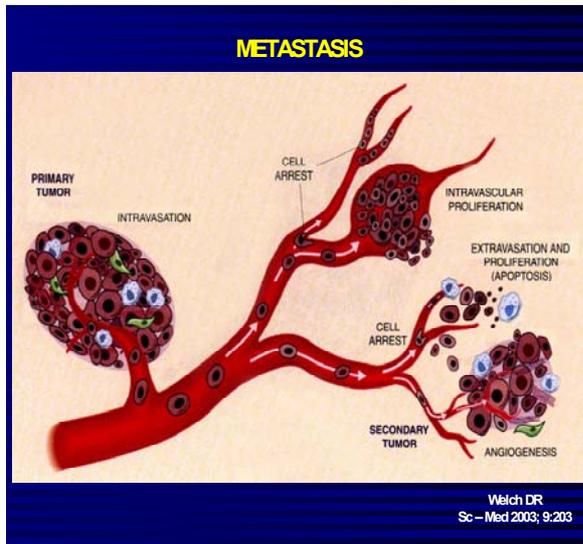
El **cáncer de pulmón** en base a su epidemiología y a su pronóstico tan sombrío, se ha convertido en un atractivo para la aplicación de la terapia génica. Bien sabemos que constituye la causa número 1 una mortalidad por cáncer en el mundo industrializado y que solamente un 10 a 15% de los pacientes están vivos al cabo de cinco años. Se han identificado blancos potenciales para dirigir la terapia génica, incluyendo el factor de crecimiento endotelial para los tumores de células pequeñas y el NCAM-1 para los de células no pequeñas (12).

Los tumores de pulmón pueden localizarse con toda precisión a través de los métodos de gabinete actuales, además los diferentes genes podrían suministrarse a través de la

circulación pulmonar por un simple cateterismo derecho o administrarse por la vía aérea para conseguir alcanzar el epitelio respiratorio. La terapia génica se ha enfocado fundamentalmente a la administración del gen P53 utilizando diferentes vectores, los cuales han topado con la limitación de conseguir una diseminación y/o transducción apropiadas. Recordemos, que los tumores no solo están constituidos por componentes tumorales sino a su vez por otros elementos importantes desde el punto de vista de la proliferación vascular, el comportamiento de los fibroblastos y la matriz extracelular. Se ha concebido que para que los adenovirus portando el gen P53 ejerzan un efecto positivo, los mismos deben conservar el segmento EI-A (12).

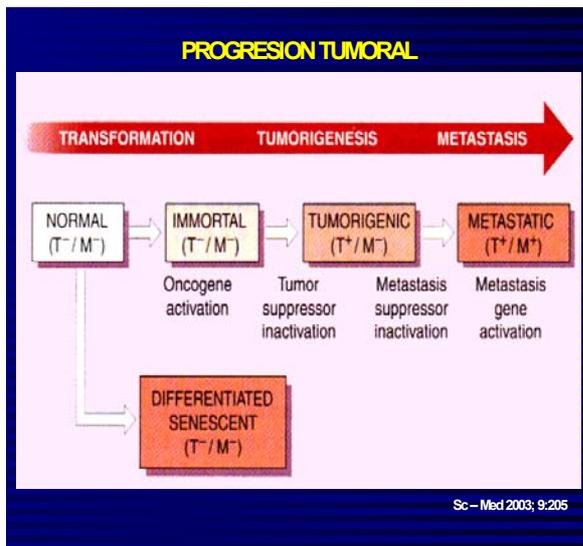
En cuanto al fenómeno de **metástasis**, la *Figura 9* ilustra este mecanismo de diseminación tumoral. Millones de células invaden el torrente sanguíneo diariamente a partir de una masa tumoral, pero únicamente una minoría dichosamente consigue finalmente colonizar exitosamente y proliferar en un sitio a distancia. En este fenómeno se involucra de manera prominente la expresión de genes activadores así como la inactivación de los genes normalmente supresores. La *Figura 9*, ilustra el mecanismo de angiogénesis tumoral ya aludido en el comentario anterior. Este mecanismo es sumamente complejo, implica una progresión dinámica que involucra una serie de fenómenos indispensables para terminar desarrollando el fenotipo metastático (*Fig 10*). Nótese como cinco "pasos" son necesarios para que desde una célula normal culmine en una de comportamiento cancerígeno con la aparición de metástasis a distancia. Participan una pérdida de la estabilidad genética global, la abolición del mecanismo de apoptosis y la activación temprana de diversos oncogenes. Estos procesos son seguidos como se señala en la figura por la inactivación de genes normalmente supresores y de aquellos supresores de metástasis y finalmente la activación de genes promotores de

Figura 9



Adaptada de 13

Figura 10



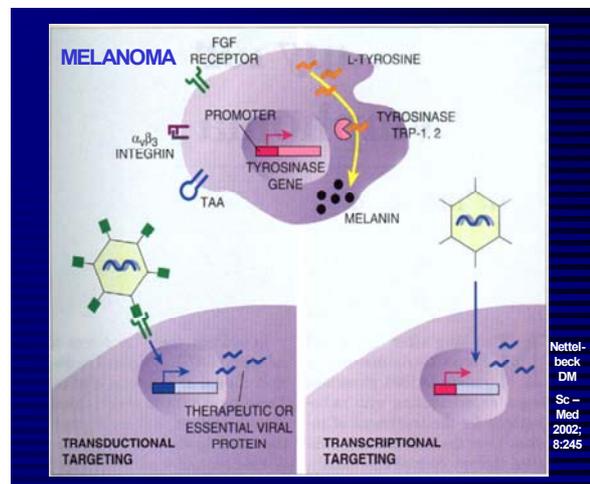
Adaptada de 13

metástasis de los cuales han sido descritos más de 50 de ellos en la última década. Estos diferentes genes son blancos de atracción para la terapia génica actual.

Los **melanomas** que hayan recibido un tratamiento convencional quirúrgico tardío o

inapropiado acarrean un pronóstico sumamente sombrío. Si bien existen tres tipos hereditarios, en quienes se han identificado los genes mutantes correspondientes, éstos constituyen la minoría de los melanomas que se ven en la práctica clínica. La gran mayoría ocurren de manera esporádica y los mismos, como se ilustra en *Figura 11*, podrían estar sujetos a la terapia génica a través de dos abordajes. En el lado izquierdo de la figura, se señala que estas células expresan receptores para el grupo de proteínas transmembránicas conocidas como integrinas a las cuales por medio de la terapia transgénica y con los vectores correspondientes se consigue bloquear los mecanismos de división celular. Por otro lado y como se ilustra en la sección derecha de la figura, estos tumores expresan diversas enzimas incluyendo tirosinasas, enzimas citoplasmáticas que podrían ser el blanco para la incorporación de diferentes vectores que podrían acarrear genes que modulen la expresión terapéutica.

Figura 11



Adaptada de 14

Distrofias musculares, distrofina

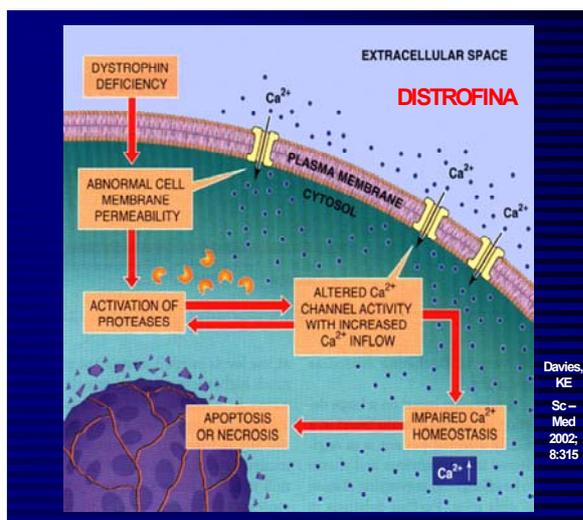
Una pérdida de la masa muscular ocurre con el envejecimiento en todos los mamíferos. El mecanismo responsable está dado por una

falla en los mecanismos de reparación. Cambios similares ocurren en los pacientes distroóficos.

Un comentario editorial relacionado a la terapia génica y su aplicación en este campo, se presentó en la Edición 43 de esta página web.

De hecho, existen una serie de entidades agrupadas dentro de las distrofias musculares que representan mecanismos donde la regeneración y/o reparación de los músculos esqueléticos está alterada. En ellos participan de manera prominente ciertas proteínas que ejecutan una serie de acciones fundamentales para mantener la integridad muscular. Una de ellas ha sido la distrofina, cuya mutación caracteriza a la distrofia muscular de Duchenne. Esta proteína, entre otras funciones, conlleva la de facilitar la conducción de energía a través de las membranas de las células musculares después de su activación en el ejercicio muscular. La carencia de la misma ocasiona, como se ejemplifica en la *Figura 12*, cambios fundamentales incluyendo un trastorno en la permeabilidad celular, un acúmulo de calcio importante en el retículo sarcoplásmico y una inducción de los mecanismos de apoptosis (15).

Figura 12



Adaptada de 15

Ensayos clínicos fases II y III con factores que promuevan la proliferación muscular utilizando el gen que codifica al factor de crecimiento parecido a la insulina, se llevan a cabo en la distrofia miotónica. En sentido contrario, se ha podido identificar que la mutación de la miostatina conlleva a una regeneración muscular desproporcionada. Esta proteína controla los mecanismos normales de crecimiento y regeneración muscular. En algunas especies de ganado, se ha observado una proliferación excesiva del tejido muscular en especies que carecen de esta proteína y permiten el desarrollo desproporcionado de tejido muscular prácticamente libre en grasa (ganado belga azul) (16).

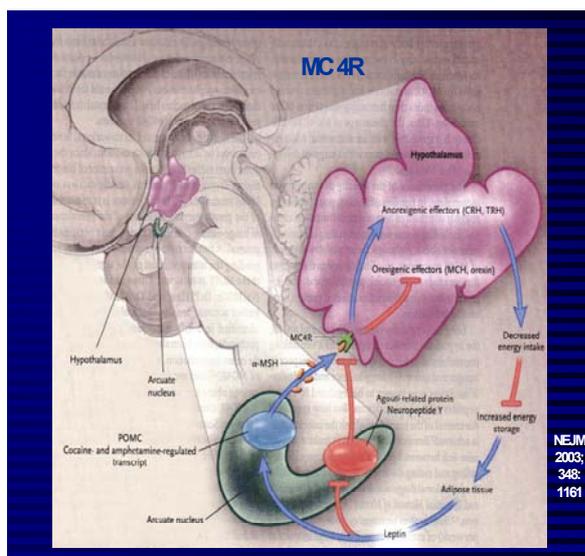
Obesidad

La obesidad transformada en una verdadera epidemia, representa una enfermedad compleja en la que se involucran mecanismos poligénicos en más del 90% de los casos. Solamente en un 5% de los obesos mórbidos factores de tipo monogénico son los responsables. Algunos de ellos se ilustran en la *Figura 13*, en la que se demuestra como existe un mecanismo de balance para mantener una homeostasis entre el tejido graso y los centros reguladores del apetito a nivel del sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo. Contrariamente a lo que se concebía con una participación prominente de la leptina, es más bien la hormona MSH o melanocítico estimulante variedad α , la que junto con su precursor el POMC, o proopiomelanocortina los que ejercen su acción en el receptor correspondiente en el hipotálamo como el anorexígeno fundamental. La mutación de su receptor (MC 4R) contribuiría de manera prominente a la hiperfagia, que acompaña a los obesos mórbidos. La leptina más bien ha sido involucrada en la morfogénesis de la estructura ósea, así como en la regulación a nivel hipotalámico de los mecanismos de descarga del sistema simpático adrenérgico, aunque la misma contribuye en la

retroalimentación con los mecanismos que controlan el apetito.

Blancos importantes para la terapia génica van a ser los receptores correspondientes de las hormonas mencionadas (17).

Figura 13



Riñones poliquisticos

Esta entidad hereditaria representa una de las principales causas de insuficiencia renal crónica definiéndose como la presencia de tres ó más quistes en cada uno de los riñones. Existen dos variedades fundamentales, incluyendo la autosómica recesiva que se expresa en la segunda y tercera década por insuficiencia renal crónica y masas palpables, y que obedecen a una mutación en los genes de la policistina I y II, afectando groseramente a 1 de cada 500 personas. Afortunadamente la variedad debida a la mutación de poliductina y que se hereda de manera recesiva, es una enfermedad que se manifiesta en la niñez y progresa a una insuficiencia renal temprana con prominente compromiso túbulo-intersticial (18).

Terapia génica y enfermedades cardiovasculares

Ver comentario editorial de la Edición 45 de esta página web (19).

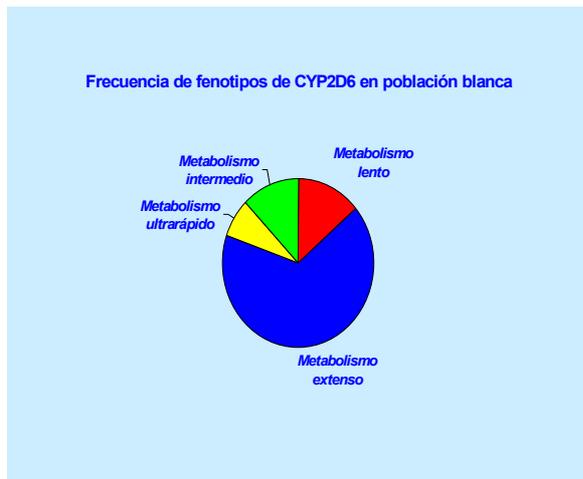
Farmacogenómica

Con la lectura del comentario editorial recientemente publicado por Caraco (20), titulado: “Los genes y las respuesta a los fármacos”, el lector fácilmente deduce la aplicación inconmesurable, que la genómica tendrá en la medicina, específicamente representada por el campo de la farmacogenómica. Como bien comenta el autor, la respuesta a los fármacos más frecuentemente empleados varía notablemente en los pacientes. Después de ingerir dosis idénticas del mismo agente, algunos muestran efectos clínicos significativos mientras otros, por el contrario, no presentan las respuestas terapéuticas esperadas. Gran parte de esta diversidad en los grados de respuestas puede atribuirse a diferencias en cuanto a la farmacocinética, especialmente involucrando al sistema de la citocromo P450, una superfamilia de enzimas que posee diversas isoformas. Dentro de estas últimas, tres son las más importantes, las CYP2C9, CYP2C19 y la CYP2-D6 las cuales son responsables de aproximadamente un 40% del metabolismo de las drogas que utilizan este sistema. Resultados de estudios metanalíticos, demuestran que la mayor parte de las reacciones adversas ocurren cuando las drogas son metabolizadas por estas enzimas, las cuales tienen o poseen polimorfismos genéticos determinados.

En la *Figura 14*, se ilustra la frecuencia de los fenotipos en la población anglosajona, en relación con el metabolismo de diversos fármacos incluyendo los β -bloqueadores, los antiarrítmicos, antidepresivos, neurolépticos y los agentes opioides. Se ilustra, como el metabolismo puede ser exageradamente rápido en un grupo de pacientes, en

contraste con uno sumamente lento; y por otro lado se analiza no solamente la variable del tiempo sino la magnitud en la cual los fármacos son metabolizados.

Figura 14



Adaptada de 20

Estos polimorfismos, o cambios en las secuencias que codifican a estos genes pueden variar notablemente en los diferentes grupos étnicos y además el conocimiento de un genotipo determinado no confiere necesariamente una predicción del fenotipo.

Consecuencia de lo anterior, pueden aparecer una gama de anomalías incluyendo la concentración subterapéutica o por el contrario, la exposición a niveles tóxicos de un fármaco; en la primera instancia un mecanismo de activación está ausente o disminuido y en la segunda, un proceso de inactivación predeterminado no ejerce su función habitual.

Una degradación inapropiada y lenta la cual permite una exposición a grandes concentraciones de opioides ha sido descrita en la literatura. Por otro lado, algunos fármacos que se administran en forma de prodrogas, se verían alterados por la carencia de los compuestos que normalmente los activan y en cuyo caso el

46-03-05-AR

resultado sería la ausencia del efecto terapéutico deseado. Algunas aplicaciones prácticas de la farmacogenómica han sido aplicadas en el terreno de la oncología, específicamente en la predicción de la dosificación de algunos agentes empleados en los protocolos de quimioterapia. La 6-mercaptopurina es un ejemplo de lo anterior, en el entendido, de que una de las enzimas fundamentales en su inactivación, la tiopurina metiltransferasa, está genéticamente determinada, y puede medirse con el fin de poder estimar el grado de sobre-exposición a que un paciente podría verse involucrado. El determinar el genotipo de esta enzima previo al tratamiento y la puesta en práctica de los ajustes correspondientes, se ha transformado en una parte esencial de la práctica clínico-oncológica actual.

Una visión para el futuro

Los principales investigadores del Instituto Nacional para la Investigación del Genoma Humano en los Estados Unidos de Norteamérica, publicaron recientemente un artículo que señala las perspectivas para la investigación a corto y mediano plazo con respecto a la dirección que tomará la genómica y sus aplicaciones potenciales a la práctica clínica. Ellas claramente establecen desde un principio, como este proyecto tendrá que seguir una serie de etapas que culminaron inicialmente con la secuencia del proyecto del genoma humano y que proseguirán con las aplicaciones de la genómica a la biología, a la salud y finalmente a la sociedad globalmente (22).

El artículo que se presenta en el formato de "Desafíos" se estructura en base a los cuatro enunciados previamente aludidos y los cuales serán resumidos en los siguientes párrafos.

En relación con la genómica y la biología, el propósito de las investigaciones futuras estará dirigido a dilucidar la estructura y función de los diferentes genomas. La comprensión global entre los componentes estructurales y funcionales será básica para

el desarrollo futuro de este campo. Lo anterior, implicará las comparaciones entre múltiples especies, enfocando aquellas que han ocupado posiciones claves dentro de la evolución y que contribuirán a refinar de manera significativa nuestra comprensión global de este complicado proceso. Otros desafíos, por así llamarlos, incluirán dilucidar la organización de las redes de comunicación entre los diferentes genes y sus productos, en el entendido de que los mismos no funcionan de manera aislada sino que participan en una encrucijada compleja de sistemas moleculares que tomados como un todo, determinan el funcionamiento de las células en los tejidos, órganos y sistemas. Por supuesto que lo anterior implicará el desarrollo de un mapa que integre las interacciones de las diferentes proteínas, sus localizaciones y funciones dentro de lo que se concibe como la proteómica. Otros desafíos implicarán la comprensión global de los mecanismos involucrados en las enfermedades hereditarias con alta prevalencia, incluyendo aquellos patrones heredados a través de diversos haplotipos.

Se menciona además, la necesidad de una mejor comprensión de los genomas ya que los mismos son estructuras dinámicas continuamente sujetas a la modificación por fuerzas ambientales. En relación al segundo apartado, que involucra las aplicaciones de la genómica a la salud, los grandes desafíos incluirán el desarrollo de estrategias robustas para contribuir a identificar los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades de mayor prevalencia y las diferentes respuestas a los fármacos.

Otro de los capítulos en esta sección, será el desarrollo de estrategias para identificar las variantes genéticas que puedan contribuir al mantenimiento de la salud y que expliquen la longevidad en diferentes grupos poblacionales. Se pretenderá el desarrollo de enfoques dirigidos a la predicción y susceptibilidad a diferentes enfermedades y la respuesta a los fármacos en las poblaciones será un hecho. La reclasificación de las enfermedades humanas

46-03-05-AR

estará basada en mecanismos fundamentalmente moleculares.

La aplicación de nuevas modalidades terapéuticas representan por supuesto uno de los atractivos fundamentales para la investigación futura, incluyendo áreas tan trascendentales como aquellas que se involucran en los mecanismos de la conducta humana y que pudiesen tener alguna implicación en la prevención y/o conservación de la salud en la mayoría de los individuos.

Con respecto al capítulo de genómica aplicada a la sociedad, los esfuerzos se dirigirán hacia la promoción en cuanto a maximizar sus beneficios y minimizar los daños, en el entendido, de que ésta como todas las ramas de la medicina se regirá fundamentalmente por el beneficio social que la misma pueda adquirir.

Otras áreas que se consideran en el documento, incluyen aquellas relacionadas hacia la comprensión de una mejor relación entre la genómica y los diferentes grupos étnicos, las relaciones desde el punto de vista ético y moral y la divulgación de toda esta información con la mínima restricción posible.

El documento incluye a su vez algunos señalamientos elementales en cuanto a los recursos disponibles, la tecnología necesaria para el desarrollo de los proyectos en el futuro, la implementación masiva de la biología computacional, la metodología para el entrenamiento de personal y las implicaciones éticas, legales y sociales así como la importancia de la educación a nivel global para aliviar al impacto que toda nueva orientación va a conllevar.

Genómica y el nuevo milenio Metas para el desarrollo, documento reciente de la OMS

Este importante organismo internacional ha puesto recientemente en la red de internet,

un documento que resume las metas básicas para el desarrollo en los próximos años, con una orientación fundamental hacia los países en vías de desarrollo (23).

En él se señalan las diez biotecnologías prioritarias para el próximo decenio. Ellas involucran a las siguientes áreas en donde la genómica tendrá un papel fundamental:

- 1) Metodología molecular en las pruebas diagnósticas.
- 2) Vacunas por combinación.
- 3) Nuevas vacunas y vías de administración de las mismas.
- 4) Conservación del medio ambiente.
- 5) Secuencia de los genomas de diversos patógenos.
- 6) La protección de las enfermedades de transmisión sexual en la mujer.
- 7) La bioinformática.
- 8) La genómica aplicada a la nutrición.
- 9) Las proteínas por recombinación con aplicación terapéutica.
- 10) La química por recombinación.

Este documento fue desarrollado en la Universidad de Toronto, a través de la contribución de importantes investigadores a nivel mundial.

Si bien el documento está accesible en la dirección:

http://www.fic.nih.gov/news/genomics_global_health.pdf el texto disponible a través del Programa Canadiense de Genómica y Salud Integral de la Universidad de Toronto (23).

Algunas de estas prioridades merecen un pequeño comentario en vista de su aplicación portencial a la práctica clínica en el futuro cercano.

En cuanto al diagnóstico molecular, el mismo tendrá que orientarse fundamentalmente hacia la facilitación en el manejo de las tres grandes entidades responsables de la morbimortalidad en el mundo, a saber: el sida, la malaria y la tuberculosis. El objetivo básico será reducir la mortalidad infantil y mejorar la salud materno-fetal, especialmente

46-03-05-AR

en los países en vías de desarrollo. Se resalta la importancia, por ejemplo, de la introducción del método de PCR ó reacción de polimerasa en cadena, la cual supera en efectividad y costo a muchos de los procedimientos tradicionales (cultivos) utilizados en el pasado para el diagnóstico de estas enfermedades. Sondas de ADN han sido dirigidas para el diagnóstico de HIV, gonorrea y herpes simplex. En el campo de las novedades se plantea la aplicación de anticuerpos producidos por plantas, a través de la modulación genética incluyendo antipapilomavirus, interesantemente algunos de estos desarrollos ya han sido sujetos a una patente.

En cuanto a las nuevas vacunas, la idea es el desarrollo de técnicas de recombinación genética para dirigirlas no solamente contra agentes infecciosos sino idealmente para combatir diversas neoplasias y procesos autoinmunes. En este sentido, se pretenderá restaurar la inmunidad no solamente a nivel humoral sino también celular. El principio de selectividad pretenderá la utilización de subunidades del genoma del patógeno contra el cual se desea inmunizar y tendría el atractivo de que estas vacunas serían probablemente menos costosas y tal vez de una aplicación más sencilla. Desafortunadamente los primeros ensayos a través de vacunas de recombinación genética contra malaria, han mostrado índices muy pobres de inmunidad. En el campo de las grandes innovaciones, plásmidos de ADN han sido incorporados a diversas plantas (por ejemplo patatas) con el fin de expresar diversos antígenos que podrían contribuir una vez consumidos a evocar respuestas inmunológicas parecidas a las vacunas. Tal es el caso del proyecto de vacunación contra hepatitis B, diarrea y sarampión utilizando esta metodología (24). De la misma manera han sido incorporados antígenos de superficie de hepatitis B en diversos cultivos de tomates o lechuga, ó especies de maíz expresando antígenos de Escherichia coli enterotóxica, los cuales podrían representar métodos de inmunización para grandes grupos de

16

población.

En cuanto a conservación de la sanidad ambiental, la misma ha representado un blanco atractivo para la aplicación de la genómica, dada la alta contaminación que se vive a nivel universal. Por ejemplo, muchos acuíferos en el sur de China están actualmente en vías de biorestauración a través de rampas conteniendo cultivo de bacterias modificadas genéticamente con el fin de conseguir su recuperación para transformarlos nuevamente en agua potable.

Cepas de *Inococcus radiodurans*, modificados por ingeniería genética han sido empleados en la detoxificación de mercurio, en diferentes acuíferos contaminados en algunos países asiáticos. *Bacillus turingiensis* en el Perú han sido empleados, en los cultivos de cocos para intentar suprimir a los vectores naturales de la malaria, los mosquitos anófeles y evitar así la contaminación con los diferentes insecticidas y en el entendido de que muchos de estos vectores se han tornado resistentes.

Grandes contaminaciones afectan los acuíferos en Bangladesh, se pretende recuperarlos a través de las bacterias NT-28, las cuales ya han recibido una patente por algunas compañías canadienses.

Finalmente y de manera muy breve es necesario mencionar la aplicación de la nutrición génica y su relación con la salud ambiental. La misma tendrá que estar orientada hacia una mejoría en la salud materno-infantil. El proyecto del "arroz de oro" fortalecido con vitamina A y E, culminó con una patente por un grupo suizo y los resultados de este proyecto están en vías de consolidación.

En países relativamente vegetarianos, la incorporación de aminoácidos esenciales se ha considerado una medida importante, habiéndose escogido plantaciones de patatas a quienes de una manera transgénica se las ha incorporado ciertos aminoácidos esenciales incluyendo lisina y metionina.

46-03-05-AR

Las aplicaciones potenciales que la genómica tendrán en la nutrición, escapan a un análisis a corto plazo, ya que las mismas reciben una enorme influencia de tipo social, político y económico para lograr su implementación y para evaluar sus riesgos y beneficios.

Referencias bibliográficas

1. Cooper RS, Psaty BM. Genomics and medicine: distraction, incremented progress, or the down of a new age? *Ann Int Med* 2003; 138:576-79.
2. Guttmacher AE, Collins FS. Wellcome to the genomic era. *N Engl J Med*. 2003; 349:996-98.
3. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953 ; 171: 737-38.
4. Judson HF. "The greatest surprise for everyone" notes on the 50th anniversary of the double helix. *N Engl J Med* 2003; 348:1712-14.
5. Khoury MJ, McCabe LC, McCabe EBB. Genomic medicine: population screening in the age of genomic medicine. *N Engl J Med* 2003; 348:50-58.
6. Carazzana M, Fisher A. Efficacy of gene therapy of SCID is being confirmed. *Lancet* 2004; 364:2155-56.
7. Berns A. Good news for gene therapy. *N Engl J Med* 2004; 350:1679-81.
8. Noguchi P. Risks and benefits of gene therapy. *N Engl J Med* 2003; 348:193-94.
9. Ponnazhagan S. Gene therapy. Adeno-associated virus vector. *Sc Med* 2002; 8:294-97.
10. Varga J. TGF β , smads and tissue fibrosis. *SC-Med* 2002; 8:298-307.
11. Wilson DR. Gene therapy. P53 gene therapy for cancer. *Sc-Med* 2002; 8:60-62.
12. Santhoff H, Hay JG. Gene therapy for lung cancer. *Sc-Med* 2003; 9:187-89.
13. Welch DR. Metastasis regulatory genes. *Sc-Med* 2003; 9:202-13.
14. Nettelbeck DM. Gene therapy. New strategies for malignant melanoma. *Sc-Med* 2002; 8:244-45.
15. Davies KE. Dystrophin associated proteins and muscular dystrophies. *Sc-Med* 2002; 8:308-17.
16. Sweeney HL. Gene doping. *Sc Amer* 2004; 291:36-43.
17. List JF, Habener JF. Defective melacortin 4 receptors in hyperphagia and morbid obesity. *N Engl J Med* 2003; 348:1160-62.
18. Grantham JJ. Polycystic kidney disease. *Sc Med* 2003; 9:128-40.
19. Quesada O. La genómica en las enfermedades cardiovasculares. Comentario Editorial, Edición 45, www.ampmd.com, 2005.
20. Caraco Y. Genes and the response to drugs. *N Engl J Med* 2004; 351:2867-69.
21. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med*. 2002; 347:1512-20.
22. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, et al. A vision for the future of genomic research. *Nature* 2003; 422:835-47.
23. Genomics and the Millenium Development goals. Canadian Program on genomics and global health. University of Toronto Joint Center for Bioethics. ISBN-0-7727-8762-x. 2004. http://www.fic.nih.gov/news/genomics_global_health.pdf
24. Srivastava I, Liu Ma. Gene vaccines. *Ann Int Med* 2003;138:550-59.