

3. Toxicogenómica: una aproximación integradora para explorar efectos tóxicos de nuevas moléculas y agilizar la selección de candidatos a desarrollo farmacéutico

JOAN ALBERT VERICAT

1. INTRODUCCIÓN

La primera consideración en un capítulo que tiene por título principal TOXICOGENOMICA es decidir si el capítulo debe tratar de TOXICOLOGIA o de GENOMICA. Para el autor la respuesta es muy simple: el capítulo versa sobre la aplicación de una tecnología (la GENOMICA) al estudio de la TOXICOLOGIA. Y como subtítulo, el impacto de dicha aplicación tecnológica como instrumento para permitir que la toxicología pueda también colaborar en la selección de productos candidatos a desarrollo libres de efectos indeseables.

El establecimiento de la secuencia del genoma humano ha sido uno de los hechos más relevantes de estos últimos años abriendo una nueva era en la investigación biológica (1). Este impacto, a parte de ser muy importante en investigación básica y en la comprensión de muchos fenómenos fisiológicos, está influyendo la investigación para el descubrimiento de nuevos fármacos ya que se abren nuevas oportunidades para encontrar nuevas actividades de interés.

Es interesante notar que sólo el 0.1% de todas las pares de bases del DNA que forman el genoma humano varían entre los individuos; al mismo tiempo debemos aceptar que este bajo porcentaje tiene efectos muy importantes para explicar las muchas diferencias que existen entre todos nosotros. Este hecho llega a su extremo con las enfermedades hereditarias, donde muy pequeños cambios pueden dar lugar a muerte prematura o deficiencias muy importantes (2-4).

Pero no todo es tan fácil. De hecho, la identificación de la secuencia del DNA es muy poco útil sino se sabe nada sobre la función de los genes y de su regulación. Consideremos que cualquier organismo superior está formado por muchos tipos celulares diferentes, cada uno con funciones diferentes e integrados en un sistema de complejidad mucho superior a lo que representaría una mezcla desorganizada de los mismos tipos celulares. Si bien cada célula contiene los mismos genes, su expresión diferencial da lugar a la diversidad necesaria para dar lugar a esa complejidad tan impresionante, y que crece desde el tejido, al órgano, para llegar al organismo. En cada nivel de complejidad, la transcripción de los genes y la traducción a proteínas da lugar a la función propia de la estructura determinada (función de un tejido, función de un órgano). El mantenimiento de esta especialización se mantiene de una forma muy controlada, con el objetivo de evitar la pérdida de la función. Nótese aquí que alrededor del 5% de los genes secuenciados parecen codificar factores de transcripción (5), todos ellos controlados en una multitud de procesos, con el objetivo de mantener el control del sistema frente a los cambios ambientales (para una revisión, consultar (6)).

Y es precisamente en este control y las respuestas asociadas donde subyace el fundamento de la toxicogenómica en particular y de la genómica en general. Cualquier cambio en el ambiente en el que se encuentran las células y tejidos va a generar una respuesta con el objetivo de mantener la homeostasis o de defenderse del ataque de cualquier xenobiótico que pueda presentar un riesgo.

En cierta forma, ya Paracelso (7), cuando dijo que “Sólo la dosis determina si una cosa es un veneno”, dejó claramente establecido que hay que superar algún límite para que una respuesta sea verdaderamente tóxica. De hecho, en los procesos de evaluación del riesgo de un producto farmacéutico con propiedades interesantes, todo reside en determinar ese límite entre la dosis responsable de la actividad terapéutica (efecto beneficioso) y la dosis dando lugar a toxicidad (efecto nocivo). Escrito de otra forma, en la determinación del margen de seguridad adecuado al efecto terapéutico deseado. Hoy en día este concepto se ha traducido como “Todas las sustancias son venenos; no hay ninguna que no sea un veneno. La dosis adecuada es la que separa un veneno de un remedio”.

Sabemos muy bien que cualquier respuesta no es simple, si no al contrario muy compleja. Sin tener en cuenta la expresión de genes, está completamente aceptado que los mecanismos de acción son muy complejos y tienen más efectos que los simples cambios en algunas macromoléculas intracelulares. Muchos compuestos tóxicos afectan la actividad enzimática, la integridad del DNA y de las membranas, el potencial redox, así como muchos otros procesos complejos.

Y si a esta complejidad añadimos las cascadas de expresión de genes, inducción, represión, traducción, efectos del tiempo y de los niveles de exposición, nos damos cuenta que nos encontramos en una situación muy complicada, en la que hay que entrar con sumo cuidado, sabiendo bien lo que se hace y haciéndose preguntas muy concretas para buscar las respuestas adecuadas y fácilmente interpretables. De una manera ilustrativa y copiando lo que se dice en los ambientes que se dedican a la toxicogenómica, ¿cuando un gen de apoptosis se induce el 20 % en una muestra, se supone que 20 % de la muestra está inducida un 100%, o bien 100 % de la muestra está inducida sólo un 20 %? Esta claro que esta última opción no es fisiológicamente posible, pues implicaría que el sistema como tal está muerto, ya que el proceso apoptótico suele ser unidireccional, y que una vez lanzado tiene dificultades en volver para atrás.

Ante esta elevada complejidad sin embargo debemos aceptar que la respuesta de cualquier célula a un fenómeno externo pasa por transcribir los genes necesarios. Así pues no hay duda que la expresión de genes es un instrumento interesante. Sin embargo, no todo es tan fácil, ya que la vida responde al ambiente, y la expresión de genes se verá modulada por factores muy diversos: dosis, tiempo de exposición, ambiente, etc. Y por tanto, la dificultad más grande será aquella de separar los cambios que son importantes de aquellos que representan una respuesta adaptativa, sin ninguna relación a la toxicología. Pensemos sólo por un instante que cuando nos comemos un buen bombón de chocolate se inducirán una serie de genes asociados a la composición del mismo y el contenido en azúcares, el potencial placer que podamos sentir (dado el caso), etc. Y nada de todo esto es tóxico.

El título del presente capítulo contempla, a parte de la genómica, dos conceptos fundamentales. El primero es una ciencia: la toxicología, de lo que ya se ha discutido un poco. El segundo concepto es la agilización del proceso de selección de candidatos en la investigación farmacéutica. Con el objetivo de profundizar en estos dos conceptos, en el presente capítulo se describirán dos ejemplos específicos; cada ejemplo se presentará teniendo en cuenta el desarrollo farmacéutico y las ventajas competitivas que la aplicación de la genómica a la toxicología aporta al proceso completo.

No podemos avanzar en este capítulo sin una pequeña introducción al funcionamiento de los chips de genes (“Gene arrays”). La figura 1 muestra esquemáticamente el funcionamiento de esta tecnología. En un soporte adecuado (cristal, nylon, celulosa) se fijan las sondas de los genes que forman el array o se sintetizan *in situ* según la tecnología de que se disponga. Una rápida búsqueda en internet permitirá al lector interesado encontrar las diferentes estrategias exis-

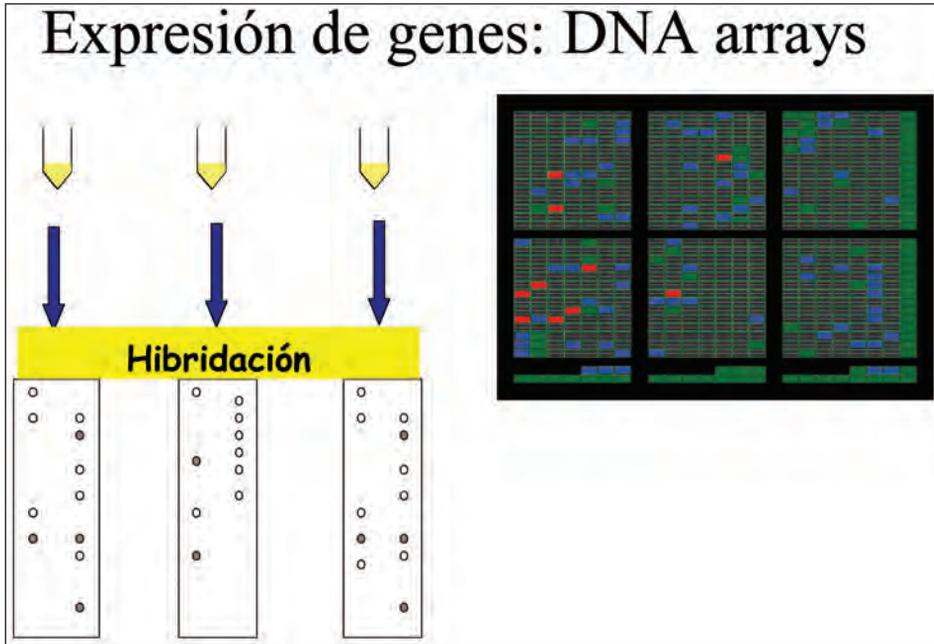


FIGURA 1. Esquema de funcionamiento de los arrays. Sobre un soporte adecuado (en el ejemplo serían cristales tipo portaobjetos; pero otros son aceptables como el nylon o la celulosa), se hibrida la muestra que se desea evaluar. Después, sea mediante radioactividad, sea con un analizador de fluorescencia, se generarán unas imágenes virtuales que indicarán qué genes están inducidos, reprimidos o cuya expresión no ha sido modificada. Así mismo, se podrá saber los genes cuya expresión es ausente en las muestras analizadas.

tentes para construir los arrays. En cualquiera de los casos, se aislará el RNA de las muestras que se deseen analizar la expresión diferencial. Este RNA se amplificará por PCR marcándolo con una señal, que podrá ser fluorescente o radioactiva para después hacerlo hibridar al soporte. Las tecnologías actuales permiten hacer la evaluación de la expresión diferencial o substracción antes o después. En el primer caso se utilizarán dos fluorocromos y la expresión diferencial será determinada por las cantidades relativas de cada fluorocromo que se unan a las sondas sobre el array. En el segundo caso se utilizará un solo marcador (fluorescente o marcaje radioactivo) y la substracción se realizará gracias al software de análisis de los resultados. Cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes. La substracción directa evita la variabilidad entre arrays, pero se consume una gran cantidad de RNA de los controles no tratados; así mismo, no permite la utilización posterior de los resultados. La substracción *a posteriori* permite realizar comparaciones con más de 2 elementos. En cualquiera de los casos, cada

uno tendrá sus ventajas e inconvenientes. La única reflexión importante es que la pregunta que nos hagamos pueda ser respondida por la aproximación genómica. El lector interesado puede profundizar en el tema en una interesante revisión en *Trends in Biotechnology* (8).

Finalmente, se recomienda al lector interesado que se sigan las evoluciones de proyectos internacionales que sin duda permitirán avanzar mucho en este sector (9).

2. EJEMPLO 1: APLICACIÓN A LA RESPUESTA DIFERENCIAL DE MODELOS EXPERIMENTALES

Todos los toxicólogos experimentales saben muy bien la importancia de los modelos experimentales. El control de calidad de los mismos, las condiciones de uso, etc. son realmente importantes en la extrapolación de los resultados al hombre. Y quizás la dificultad es que hoy, con lo mucho que ha avanzado la ciencia, esta extrapolación es todavía muy empírica, y basada en prueba y error. Una de las etapas fundamentales en el desarrollo de un nuevo producto de interés terapéutico pasa por los ensayos en el hombre. Los estudios de fase 1, los primeros que se realizan, el “FIRST TIME IN MAN”, se basan en criterios de protección de los primeros voluntarios sanos. Dada la dificultad en extrapolar correctamente, se utilizan las dosis sin efecto en las especies más sensibles y después de aplicar un factor de corrección se establecen las dosis a utilizar en el hombre. Aún en el caso en que partiendo de dosis muy bajas se pueda realizar un escalado de las mismas suficiente que permita obtener exposiciones suficientes en ausencia de efectos secundarios, la dificultad en extrapolar genera estudios más largos, aumentando los costes de realización.

Quizás lo más importante es la dificultad de extrapolar potenciales efectos negativos dada la diferencia entre modelos experimentales incluido el hombre (10).

Pero si la situación en el pasado era complicada, hoy lo es mucho más. El conocimiento que tenemos del genoma humano nos ha permitido generar un gran número de cepas transgénicas de roedores como modelos experimentales de diversas enfermedades para explorar la actividad de los fármacos en desarrollo. Los modelos transgénicos nos sirven para explorar eficacia de compuestos en enfermedades complejas, como son las enfermedades degenerativas, donde el proceso de la enfermedad puede ser largo y se necesitan tratamientos durante periodos prolongados con el producto en evalua-

ción para poder evaluar su potencial eficacia. La experiencia propia de Neupharma S.A. en la búsqueda de compuestos activos contra la enfermedad de Alzheimer muestra que algunos compuestos prácticamente inocuos en ratones silvestres con el fondo genético de un transgénico de interés, son bastante más tóxicos en el modelo transgénico. Dado que la definición de la dosis a utilizar en el hombre se basa en los datos obtenidos en las especies más sensibles, los animales transgénicos pueden ser una fuente de problemas de difícil solución.

El caso que representa la toxicidad diferencial del dibenzocarbazole (DBC) según la cepa de ratón utilizado es un ejemplo muy interesante. El DBC es uno de los compuestos químicos más tóxicos que existen, con un elevado potencial de hepatocarcinogénesis en ratones, mediante un mecanismo mixto de genotoxicidad, inducción de apoptosis, seguida de una proliferación celular que fija el fenotipo mutado y termina en la instalación del proceso tumoral (11).

Cuando se tratan ratones de dos cepas diferentes (DBA2 y XVIIIncz), la genotoxicidad medida como aductos al DNA es entre 100 y 1000 veces superior para la cepa DBA2, apareciendo los tumores hepáticos antes y a dosis más bajas. Sin embargo, los niveles plasmáticos son similares y no es posible concluir que dicha toxicidad diferencial deba asociarse a propiedades diferenciales de absorción. Muchos factores pueden estar en el origen de dicha respuesta diferencial; explorarlos todos puede llevar mucho tiempo y unos costes nada despreciables.

En cambio, si se realiza un ensayo de expresión diferencial de genes en las dos cepas, se pueden abrir una serie de hipótesis en un tiempo razonable que permita avanzar el proyecto. Para ello se decidió realizar una sola administración de dibenzocarbazole (0.05 μ M) en la piel de las dos cepas de ratones. Después de 48 horas, los animales se sacrificaron y después de extraer el RNA, amplificarlo y marcarlo con 33 P, se hibridó con membranas Clontech. Los resultados que se muestran en la figura 2 indican que en la cepa DBA2 se encuentran mucho más inducidos genes de stress asociados a genotoxicidad y genes de metabolismo. Es fácil suponer a partir de estos resultados que a parte de diferencias en absorción-excreción no evaluadas con esta tecnología, que las diferencias observadas pueden estar relacionadas con un metabolismo diferencial en las dos cepas, responsable de una producción superior de entidades reactivas, mayor stress oxidativo, mayor genotoxicidad (confirmando de forma indirecta el mayor número de aductos al DNA) y la concomitante inducción de genes de reparación del DNA.

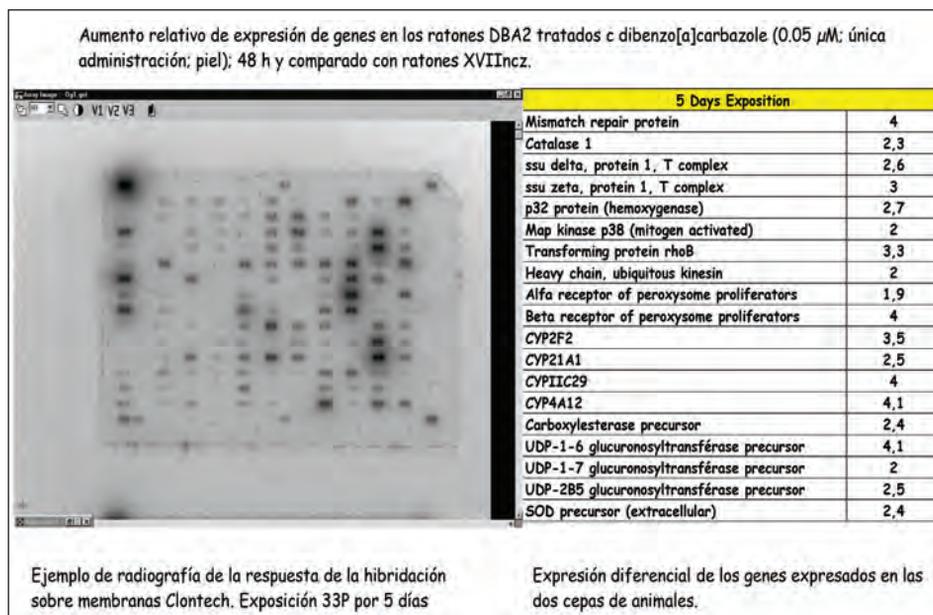


FIGURA 2. Ejemplo de resultados obtenidos estudiando la expresión diferencial de genes entre dos cepas diferentes de ratones (DBA2 y XVIIIncz), ambos tratados una sola vez por vía cutánea con DBC.

Hay que comprender que esta aproximación experimental solo da lugar a una hipótesis de trabajo, en un tiempo muy limitado, reduciendo los costes de forma muy importante.

En cualquier caso aproximaciones de este tipo pueden ser muy importantes cuando se utilizan cepas transgénicas con susceptibilidades diferenciales importantes a los productos en investigación. No hay que olvidar en ningún momento la importancia de los efectos secundarios en el momento de construir un dossier para iniciar los estudios clínicos y que es muy importante excluir efectos secundarios importantes en las dosis activas a utilizar en el hombre.

3. APROXIMACION AL ESTUDIO DE MECANISMOS DE TOXICIDAD

3.1. Premisas

Tal como hemos visto en el ejemplo anterior, la demostración de cualquier hipótesis requiere la aplicación de aproximaciones más complicadas, analizan-

do el impacto del tiempo de exposición o los efectos en función de la dosis administrada, así como toda la información disponible.

Tal como se ha indicado en la introducción, el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso muy largo y costoso. La búsqueda de eficacia y contención de costes ha llevado a una organización especializada del trabajo, con formas de trabajar muy diferentes según la fase del proceso en la que nos encontremos. Lo cierto en cualquier caso es que estas fases, aunque puedan estar solapadas en el tiempo durante un periodo, suelen ser secuenciales; es decir, cuando una molécula cambia de fase, es probable que las actividades de la fase precedente lleguen incluso a cambiar de proyecto. No es económicamente aceptable que si un producto presenta expectativas de éxito con propiedades suficientes (administración fácil, vida media suficiente, efectos secundarios aceptables, etc.), los investigadores vayan a continuar trabajando para generar un competidor para un propio producto. Entonces en un plazo razonable, los recursos de comenzarán a dedicar a otros intereses.

Sin embargo, las etapas posteriores a la selección de un candidato son largas, pudiendo llegar a más de 4 años por ejemplo en toxicología reglamentaria si es necesario incluir estudios de carcinogénesis en roedores. En el caso que se encuentren efectos negativos, difíciles de modular, es muy probable que el proyecto sea cancelado, con la concomitante pérdida de la inversión realizada. Incluso, si se desea intentar comprender los mecanismos de dichos efectos tóxicos encontrados, la investigación necesaria para ello va a necesitar tantos recursos, sin saberse *a priori* si va a ser posible desarrollar una aproximación experimental para seleccionar productos de reemplazo, la decisión pragmática es dejar el problema en el archivo y esperar tiempos mejores.

Sin embargo la disponibilidad de la genómica y quizás de la proteómica (cuando se resuelvan los problemas de productibilidad de las técnicas existentes), ofrecen posibilidades muy interesantes para poder sacar valor añadido de unas observaciones negativas y poder intentar encontrar un método experimental para la selección de productos de reemplazo en un plazo razonable.

3.2. Caso representativo

Un ejemplo interesante es el metapirileno, un compuesto desarrollado como un antihistamínico, pero que induce hepatocarcinomas en ratas. Si bien el producto presenta un perfil complejo en los ensayos de genotoxicidad, se puede decir que su perfil toxicológico es manejable, con el hígado como órgano diana (Tabla 1). El único efecto no manejable es la hepatocarcinogéne-

TABLA 1

<h2>Metapirileno.HCl</h2>	
Uso terapéutico (retirado en 1965)	Antihistamínico, unión a H1. inductor de sueño, alergia, resfriado.
Vida media	rata: ~ 2-3 h en plasma.
Metabolismo	Principalmente bioactivado por el CYP2C11. Formación de MP N-óxido, ácido mono-N-desmetil-MP. 2-tiofenecarboxílico y varios glucurónicos. Los metabolitos están sujetos a recirculación enterohepática.
Mechanismos	Hepatocarcinogenicidad: Fuente inductor de proliferación celular, dando lugar a citotoxicidad y regeneración posterior. Inducción de tumores hepáticos en 100% de las ratas tratadas. Citotóxico, causando necrosis periportal en el hígado. Inhibición de actividades CYP2C11, CYP3A, CYP2A. Cambios morfológicos y disfunciones mitocondriales. Genotoxicidad conflictiva <i>in vitro</i> .

sis que se da en 100% de las ratas tratadas y que por tanto es definitivo en esta especie animal. Así pues, nos encontramos con un producto que tiene unas propiedades interesantes, en el que la empresa que lo desarrolló realizó inversiones importantes. Y que desgraciadamente, al final tuvo que ser retirado del mercado. Hay que reconocer que obtener valor añadido a una situación tan negativa como la descrita y en tiempos razonables puede ser muy útil para sacar provecho a todo el conocimiento acumulado en las etapas precedentes en el proceso de R+D.

La disponibilidad de las técnicas de genómica nos abre una oportunidad interesante. Se puede tratar una serie de animales por un tiempo determinado y evaluar el perfil diferencial de expresión de genes. La integración de estos datos junto con todo el conocimiento disponible sobre la molécula puede sin duda ayudarnos establecer el mecanismo (o al menos inducir hipótesis explicativas) por el cual el compuesto da lugar a su efecto negativo en la rata.

Pero en este escenario estamos obligados a añadir algunos experimentos adicionales. Es evidente que aunque establezcamos definitivamente el mecanismo por el cual se genera la hepatocarcinogénesis en rata, no podemos realizar ensayos de carcinogénesis para analizar los productos de reemplazo y seleccionar aquel que este libre de dicha propiedad. Se necesita alguna aproximación

experimental *in vitro*, que pueda aplicarse con una productividad suficiente como para estudiar un número importante de productos.

Una necesidad fundamental en la selección de ensayos *in vitro* es asegurarse de que el modelo reproduce suficientemente el órgano diana donde se ha producido el efecto tóxico. En el ejemplo que nos ocupa, jugamos con ventaja ya que uno de los órganos en los que ha avanzado más desde el punto de vista de modelos experimentales *in vitro* es el hígado. Probablemente ello puede estar relacionado con el hecho que el hígado es el órgano primero donde se metabolizan los xenobióticos en general y los fármacos en particular (12). Incluso los fenómenos de hepatotoxicidad, incluidas las hepatitis fulminantes, son fenómenos importantes en la búsqueda de fármacos y, por tanto, se ha dedicado mucho esfuerzo. Así pues, en el caso que nos ocupa la situación es relativamente fácil ya que existen un gran número de modelos (cultivos primarios, líneas de hepatoma, cortes de hígado en cultivo, perfusión *ex vivo* o *in situ*). Cada uno de estos modelos tiene ventajas e inconvenientes. Probablemente los cultivos primarios son el modelo de elección en una evaluación inicial del problema: Los cultivos primarios presentan unos niveles de capacidad metabólica interesante, mientras que las líneas celulares de hepatoma presentan unas propiedades muy limitadas. Los cortes de hígado en cultivo presentan unas propiedades razonables, pero presentan una complejidad experimental que no permite su inclusión en las aproximaciones experimentales de evaluación precoz de productos. Lo mismo es aplicable a los sistemas de hígado perfuso *ex vivo* o *in situ*.

Así pues parece razonable incluir un estudio en hepatocitos de rata en cultivo.

Los diseños experimentales para este estudio se describen en la figura 3.

3.3. Resultados en toxicología general

Las figura 4 muestra ejemplos de los resultados de histopatología encontrados en este ensayo. Puede verse que en los animales tratados a 100 mg/kg/día, ya en día 3 presentan síntomas de hepatotoxicidad con inflamación periportal, células en mitosis, proliferación de células ovales y microvacuolización intracelular. En la dosis baja sólo se observan algunas mitosis e inflamación. Los efectos descritos se encuentran aumentados de forma importante a fin de estudio, donde se puede observar que la proliferación de células ovales ha alcanzado ambas regiones hepáticas (periportal y centrolobular), se observa basofilia en la zona periportal, células en apoptosis y colestasis. Prácticamente se detectan

Protocolo experimental	
Estudio In vivo	Estudio In vitro
<ul style="list-style-type: none"> • Especies: Ratas macho Sprague-Dawley • Dosis : 0 - 30 - 100 mg/kg/d (gavage) • Sacrificio: días 3 y 28 • Número de animales: 4 / tiempo y dosis • Signos clínicos • Bioquímica • Organo diana: hígado <ul style="list-style-type: none"> – Histopatología (incluyendo TEM) – Aislamiento de RNA – Extracción de proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatocitos primarios en cultivo <ul style="list-style-type: none"> – Dosis: 15, 30, 150 µg/ml – Muestras: 3, 24 h – Morfología, bioquímica, ATP, liberación de enzimas, GSH, genes apoptosis (RT-PCR). • Aislamiento de RNA y extracción de proteínas

FIGURA 3. Resumen del esquema experimental seguido en los tratamientos in vivo o in vitro con metapirileno.

las mismas observaciones en la dosis baja, pero con menor intensidad. En la tabla 2 se resumen las observaciones histopatológicas, mostrando un claro efecto dosis y tiempo dependientes. En conclusión, un definitivo efecto hepatotóxico se observa en las ratas tratadas con metapirileno.

3.4. Resultados en expresión diferencial de genes en los hígados de los animales tratados con metapirileno

Dos aproximaciones diferentes se han utilizado para explorar la expresión de genes. Se han usado la plataforma de Affimetrix y la plataforma de Phase 1.

La primera pregunta que se debe responder cuando se realiza un estudio de este tipo es saber hasta donde las muestras son diferentes. La figura 5 nos indica como se diferencian los 4 grupos experimentales. Nótese que los grupos que se parecen más son los grupos de tratamiento a la dosis fuerte (100 mg/kg/d) sea al día 3 o al día 28. Después se incorpora el resultado del tratamiento con 30 mg/kg/d durante 28 días, siendo el de 30 mg/kg/d por solo 3 días el más diferente. El resultado es perfectamente congruente con una toxicidad que es dosis y tiempo dependiente.

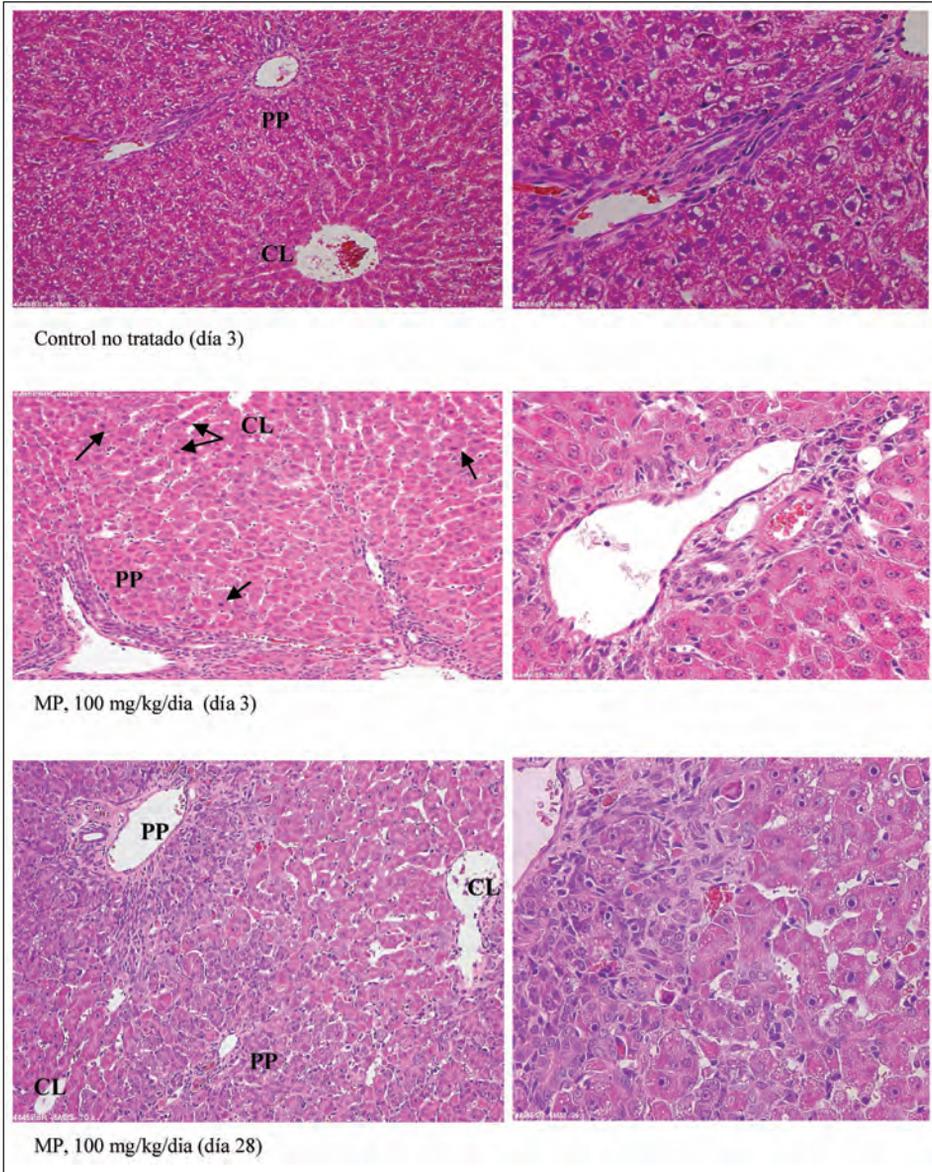


FIGURA 4. Ejemplos de microfotografías obtenidas a partir de muestras de hígados de los animales tratados con metapirileno. Nótese la dosis respuesta característica del tratamiento.

De todas formas, dado que cada grupo de tratamiento está formado por 4 animales, es muy interesante determinar si estas diferencias se mantienen cuando se analizan los animales individuales y cual es el grado de variabilidad in-

TABLA 2

		Day 3	Day 28
30 mg/kg/d	Mitosis hepatocelular	2-2-2-2	2-2-3-4
	Infiltración células inflamatorias (PP)	1-1-1-1	1-1-1-1
	Proliferación células ovas (PP)	0-0-0-0	1-2-1-1
	Microvacuolización hepatocelular (PP)	0-0-0-0	1-1-1-1
100 mg/kg/d	Mitosis hepatocelular	0-0-0-0	0-0-2-0
	Infiltración células inflamatorias (PP)	3-3-2-2	1-1-1-2
	Fibrosis (PP)	0-0-0-0	2-2-2-2
	Proliferación células ovas (PP a CL)	2-2-2-2	3-3-4-2
	Microvacuolización hepatocelular	0-2-2-2	2-2-3-2
	Apoptosis hepatocelular (PP, MZ)	2-1-2-1	3-2-3-2
	Basofilia hepatocelular (PP)	0-0-0-0	3-3-4-2
	Anisocariosis, anisocitosis (CL)	0-0-0-0	1-0-3-0

PP: Área periportal, MZ: área intermedia, CL: área centrolobular
 0: sin cambios, 1: mínimos, 2: ligeros, 3: moderados, 4: severos

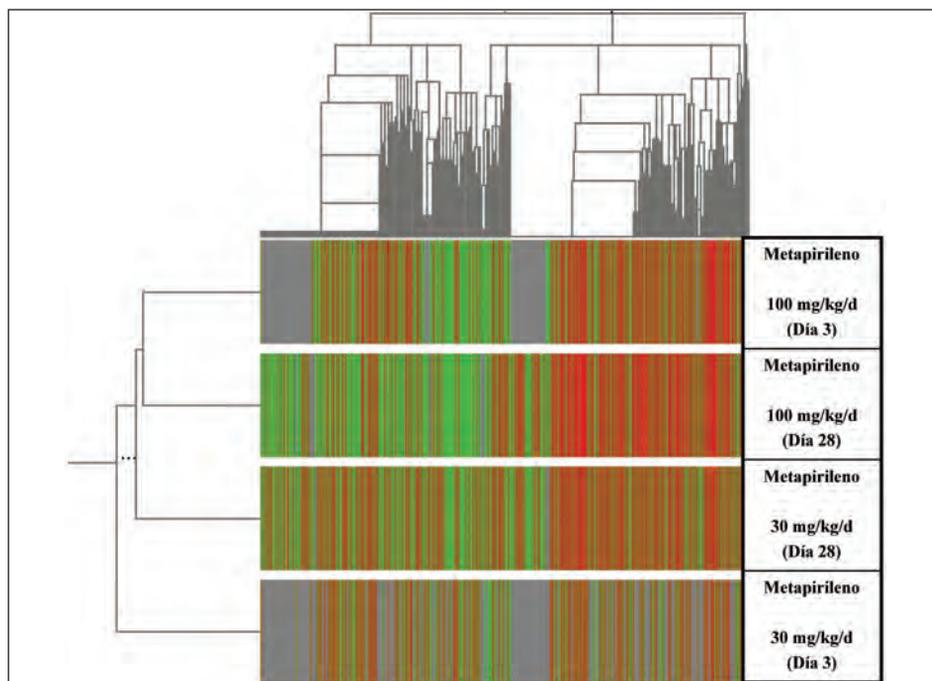


FIGURA 5. Análisis de cluster de los 4 grupos experimentales tratados con metapirileno.

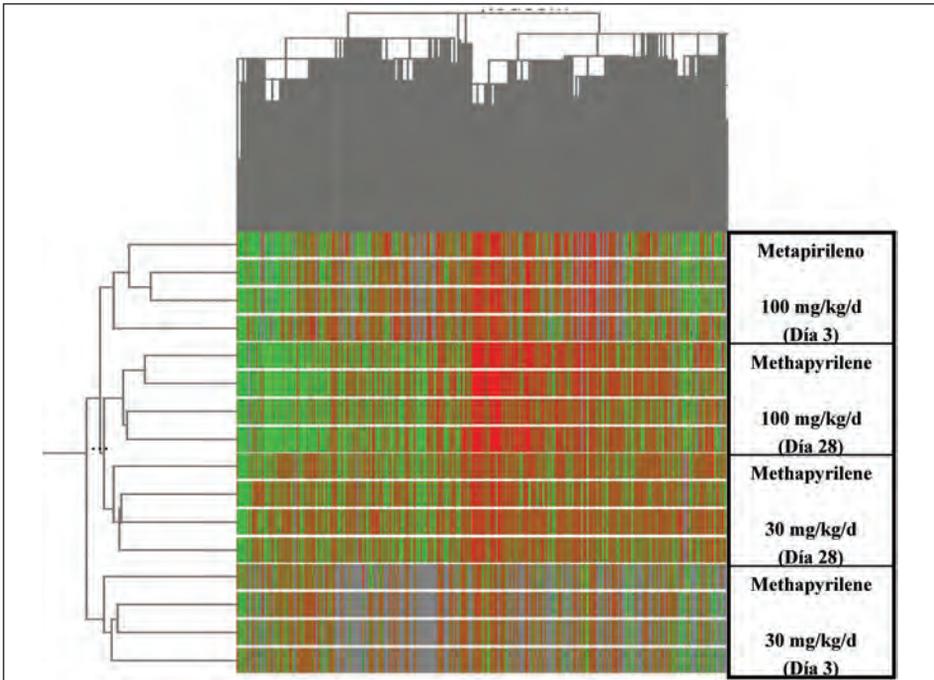


FIGURA 6. Análisis de cluster de los animales individuales tratados con metapirileno. Nótese la homogeneidad general dentro de cada grupo. Ello es sintoma de la robustez de la tecnología.

tragrupo. La figura 6 muestra que los datos son homogéneos dentro de cada grupo de tratamiento. En este caso la similitud entre grupos ha cambiado y se parecen más los perfiles de expresión diferencial a 28 días sea cual sea la dosis.

Estos resultados tomados en su conjunto indican que los sistemas que estudian la expresión diferencial de genes son robustos como para permitir separar condiciones experimentales diferentes. Así mismo, y muy fundamental para que las conclusiones derivadas de un estudio de este tipo sean aceptables, se demuestra la homogeneidad de los datos individuales de cada grupo, ya que se agrupan en “clusters” homogéneos.

Este tipo de tecnologías son costosas. Pero al mismo tiempo por esta misma razón es muy importante que el diseño experimental contenga todos los elementos necesarios para ser válido. En este estudio hubiera sido suficiente quizás con 3 animales por grupo; pero en cualquier caso es muy importante que se pueda confirmar que la respuesta obtenida es una respuesta de grupo y por tanto una respuesta general, y no que pueda tratarse de una respuesta individual.

TABLA 3. *Número de genes inducidos o reprimidos después del tratamiento con metapirileno con las dosis y los tiempos indicados.*

<i>N.º de Genes</i>	<i>30 mg/kg/d 3 días</i>	<i>30 mg/kg/d 28 días</i>	<i>100 mg/kg/d 3 días</i>	<i>100 mg/kg/d 30 días</i>
PRESENTES	1438	2480	1887	2686
Inducidos (SLR > 1)	8	124	263	386
Reprimidos (SLR < -1)	37	60	83	309

Un siguiente aspecto a considerar en este tipo de aproximaciones es la visualización general del número de genes cuya expresión ha cambiado por causa del tratamiento efectuado. La tabla 3 muestra un claro efecto dosis y tiempo en relación al número de genes cuya expresión se ha modificado, o incluso aquellos que no expresan,

El sistema informático de la plataforma Phase 1 permite visualizar los resultados mediante una clasificación de los genes individuales a diferentes fenómenos biológicos: stress, metabolismo, ciclo celular, apoptosis, anti-apoptosis, colestasis, etc. En las figuras 7 y 8 se muestran algunas familias de dichos genes, y sus cambios de expresión en función de tiempo de tratamiento y dosis.

Un primer análisis de estos resultados muestra la existencia de un efecto dosis y un efecto tiempo que se relacionan perfectamente con la histopatología. Así mismo se confirma la homogeneidad de los datos individuales ya que las tendencias de expresión de los genes individuales son homogéneas al interno de cada grupo. Quizás se puede considerar que el grupo de animales tratados por 3 días a la dosis de 30 mg/kg/d son los menos homogéneos. Este fenómeno es intrínseco a la tecnología en si misma. Las comparaciones son relativas al grupo control no tratado. Cuando no hay una inducción o represión de genes asociadas a un tratamiento cualquiera, entra en juego la variabilidad individual. Los niveles de expresión de los genes individuales nunca serán idénticos cuando no hay un efecto externo. Estas pequeñas variaciones son tomadas en consideración por el paquete estadístico y por tanto se consideran poco homogéneos. Precisamente esta es otra razón para que cada grupo de tratamiento tenga el tamaño suficiente. Quizás en el caso de respuestas muy limitadas el número de individuos en los grupos deba aumentarse. Aunque la relevancia de un resultado en dichos casos es difícil hoy por hoy, ya que hay datos históricos muy limitados.

3.5. Extrapolación de los resultados; integración datos in vivo y datos in vitro

El análisis de este tipo de resultados no es trivial. Hay posibilidades de utilizar sistemas informáticos muy sofisticados que establezcan relaciones en las cascadas de genes, que en cierta forma es lo que se ha representado en las figuras 7 y 8. Y ello, por si mismo ya es informativo, pues permite deducir aproximaciones explicativas al fenómeno observado.

Sin embargo el autor considera que en el caso que nos ocupa es mucho más eficaz realizar un análisis dosis-dependiente y tiempo-dependiente de los genes cuya expresión se ha modificado e integrarlos con los datos disponibles de toxicología.

Este ejercicio permite establecer una “imagen” del mecanismo de toxicidad del producto estudiado (figura 9).

Ahora pasemos a considerar los resultados obtenidos *in vitro*. Podemos ver (tabla 4) que el análisis integrado de la expresión diferencial muestra que en ge-

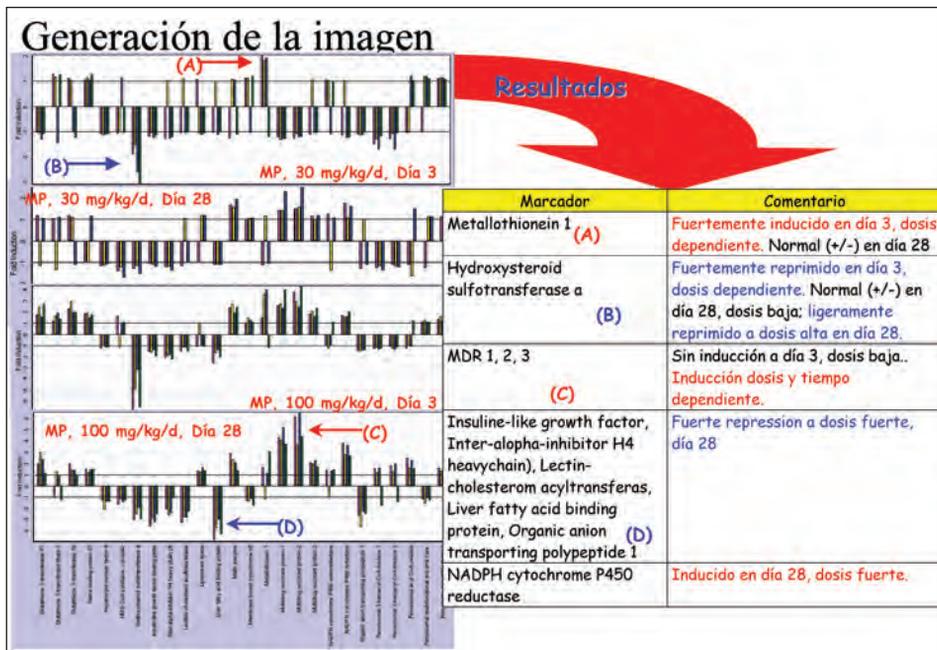


FIGURA 9. Ejemplo de clasificación de los genes según su comportamiento en los diferentes momentos que se obtuvieron las muestras. El objetivo del ejercicio es tratar de establecer relaciones tiempo y dosis dependientes.

TABLA 4

Genes comunes hepatocitos / hígado

Activating transcription factor 3
 Alpha-2-macroglobulin
 Alpha-fibrinogen
 Aryl sulfotransferase
 ATPase inhibitor (rat mitochondrial IF1 protein)
 Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase isozyme 1
 Calpactin I heavy chain
 Carbonic anhydrase II
 Carbonic anhydrase III
 Caspase 6
 Catechol-O-methyltransferase
 Cholesterol 7-alpha-hydroxylase (P450 VII)
 Connexin-32
 Cyclin D1
 Cyclin G
 Cytochrome P450 1A2
 Cytochrome P450 3A1
 Cytochrome P450 4A1, 50-mer
 Ferritin H-chain
 Gadd153
 Gamma-actin, cytoplasmic
 Glucose-regulated protein 78
 Glutathione S-transferase mu-2
 HMG CoA reductase
 HMG-CoA synthase, mitochondrial
 Hydroxysteroid sulfotransferase a
 Integrin beta1
 Interferon inducible protein 10
 Interferon related developmental regulator IFRD1 (PC4)
 K-cadherin
 Lactate dehydrogenase-B
 Major acute phase protein alpha-1
 Matrix metalloproteinase-1
 Metallothionein 1
 Multidrug resistant protein-2
 Mx1 protein
 Na/K ATPase alpha-1
 Ornithine decarboxylase
 p70 ribosomal protein S6 kinase alpha-1
 Paraoxonase 1
 Thioredoxin-1 (Trx1)
 Proliferating cell nuclear antigen gene
 Transthyretin
 UDP-glucuronosyltransferase 1A6
 VL30 element
 Zinc finger protein

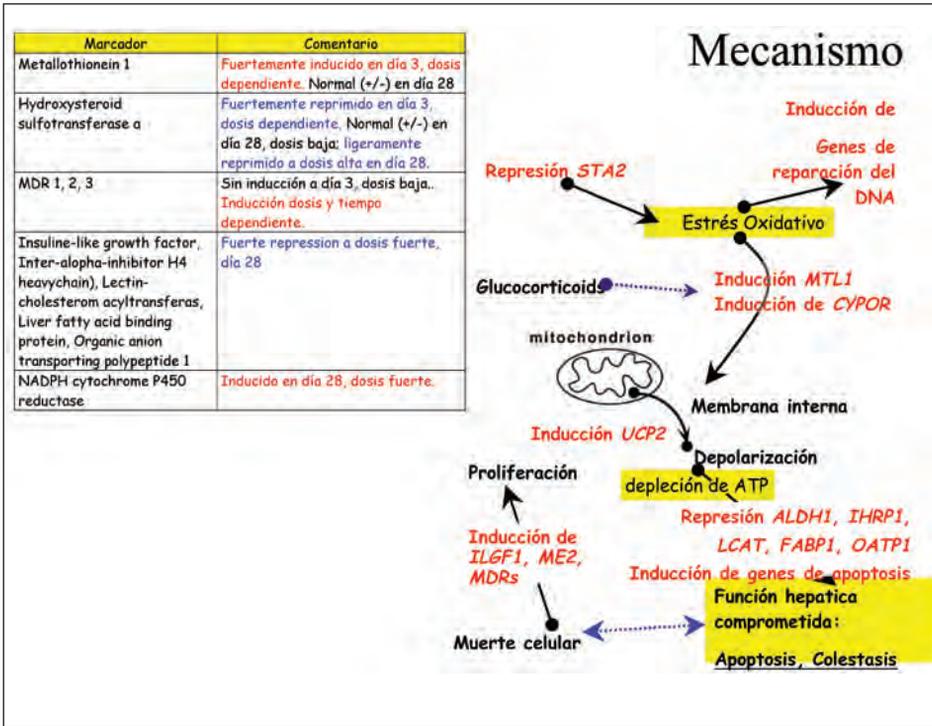


FIGURA 10. Modelización de los resultados deducidos en la figura 9, que permite el establecimiento de un modelo de mecanismo de toxicidad.

neral las respuestas encontradas en este ejemplo son completamente diferentes. De hecho se podría concluir a primera vista que las respuestas obtenidas son completamente diferentes.

Fundamentalmente, un resultado de este tipo no va contra la inteligencia, ya que la expresión de fondo es muy diferente. Este resultado parece indicar que los modelos *in vitro* son una pobre representación de los modelos *in vivo*. Con independencia de las diferencias en complejidad existentes entre los seres superiores y los cultivos primarios celulares, estos resultados parecen sugerir que a nivel molecular la relación *vitro/vivo* es pobre. Sin embargo, hay que considerar que la capacidad homeostática de un sistema vivo es mucho superior comparado con un cultivo celular, donde el devenir está prácticamente establecido (un cultivo celular muere o prolifera).

Lo más notable de este fenómeno es que si se consideran los genes comunes a ambas situaciones (los genes considerados asociados al mecanismo de to-

xicidad observado *in vivo*, junto con los genes de expresión modificada *in vitro*), podemos ver que aquellos cuya expresión cambia *in vitro* son los mismos o están relacionados con aquellos que permiten explicar el mecanismo de toxicidad de nuestra molécula.

Ello nos permite derivar una conclusión muy interesante y es que la aproximación *in vitro*, cuando se realiza comparativamente a la evaluación del mecanismo de toxicidad *in vivo*, permite convalidar casi directamente un modelo de screening para productos de sustitución que lleguen directamente de los departamentos de investigación.

Este aspecto tiene una importancia trascendental ya que permite acercar los tiempos de los estudios explicativos de toxicología a los que se aplican en los departamentos de búsqueda de productos, y por tanto, permiten establecer un valor añadido muy importante a la investigación.

Aproximaciones próximas a esta ya han demostrado su valor, todo ello confirmando la madurez de estas tecnologías (13-15).

Quedan aún muchas cosas por hacer. No hay duda que la informática continuará avanzando y ello nos permitirá avanzar de forma más fácil en la evaluación de los resultados (16, 17), permitiendo la integración de un número mucho más importante de parámetros en los estudios y aumentando la complejidad de los mismos.

4. CONCLUSIÓN

En este capítulo se han descrito dos ejemplos diferentes sobre la aplicación de la genómica a las cuestiones de la toxicología y como pueden impactar en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Una primera conclusión a tener en consideración es que el diseño experimental debe responder a la pregunta que nos planteamos. La gran cantidad de resultados que se obtienen gracias a estas aproximaciones experimentales es de tal magnitud, que si la pregunta no es correcta las conclusiones serán básicamente erróneas. Consideremos aquí el papel negativo que tiene el coste de estas aproximaciones que nos llevará a reducir al máximo los diseños experimentales, el número de muestras, las repeticiones, etc. No hay duda que una gran reflexión se necesita en el momento de diseñar un experimento.

Asimismo, a parte de la aplicación de estas tecnologías para establecer nuevas hipótesis sobre aspectos concretos (ejemplo 1.º), su implementación en los

estudios de toxicología, si se integra adecuadamente con ensayos in vitro, permite un acercamiento muy útil del Desarrollo a la Investigación y, lo que es muy importante, dar valor añadido a aquellas observaciones negativas que hasta ahora representaban que un producto, portador de efectos indeseados, terminara fuera del proceso de I+D, con la consiguiente pérdida de dinero y de tiempo en todo el proceso.

No hay duda que el proceso de búsqueda y desarrollo de nuevas medicinas, en el futuro próximo, se verá agilizado gracias a la integración de las X-ómicas, no sólo la genómica, sino también la proteómica, la metabolómica, la celómica.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Davies, K. (2001). After the genome: DNA and human disease. *Cell* 104, 465-467.
- (2) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, R., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4a edición. Garland Publishing, New York, USA.
- (3) Habener, J.F. y Williams, G.H. (2002). *Metabolic Basis of Common Inherited Diseases*, 1a edición. W.B. Saunders.
- (4) King, R.A., Rotter, J., y Motulsky, A.G. (2002). *The Genetic Basis of Common Diseases*, 2a edición, Oxford University Press, Oxford, UK.
- (5) Tupler, R., Perini, G., y Green, M.R. (2001). Expressing the human genome. *Nature* 409, 832-833.
- (6) Orphanides, G y Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expresión. *Cell* 108, 439-451.
- (7) Borzelleca, J.F. (2000). Paracelsus: Herald of modern toxicology. *Toxicological Sciences* 53, 2-4.
- (8) Venkatasubbarao, S. (2004). Microarrays - status and prospects. *Trends in Biotechnology* 22: 630-637.
- (9) Penni, W., Pettit, S.D. y Lord, P.G. (2004). Toxicogenomics in risk assessment: An overview of an HESI collaborative research program. *Environmental Health Perspectives* 112: 417-419.
- (10) Fielden, M.R. y Zacharewski, T.R. (2001). Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicological Sciences* 60 : 6-10.

- (11) Dorchies O., Perin-Roussel O., Gillardeaux O., Vericat J.A., Roome N.O., Prenez A., y Perin F. (2001). Induction of DNA synthesis in mouse liver following increases of DNA adduct levels elicited by very low cumulative doses of the genotoxic hepatocarcinogen 7H-dibenzo[c,g]carbazole. *Toxicologic Pathology* 29, 528-534.
- (12) Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V. y Jover, R. (2004). Human hepatocytes in primary culture : The choice to investigate drug metabolism in man. *Current Drug Metabolism* 5, 443-462.
- (13) Jung, J.W., Park, J.S., Hwang, J.W., Kang, K.S., Lee, Y.S., Song, B.S., Lee, G.J., Yeo, C.D., Kang, J.S., Lee, W.S., Jeon, K.S., Um, C.H., Kim, Y.S., Oh, M.J., Youn, J.P., Li, P., Park, J.E. y Hwang, Y. (2004). Gene expression analysis of peroxysome proliferators- and phenytoin-induced hepatotoxicity using cDNA microarray. *Journal Veterinary Medicine Sciences* 66: 1329-1333.
- (14) Kier, L.D., Neft, R., Tang, L., Suizu, R., Cook, T., Onsurez, K., Tiegler, K., Sakai, Y., Ortiz, M., Nolan, T., Sankar, U. y Li, A.P. (2004). Applications of microarrays with toxicologically relevant genes (tox genes) for the evaluation of chemical toxicants in Sprague Dawley rats in vivo and human hepatocytes in vitro. *Mutation Research* 549: 101-113.
- (15) Kramer, J.A., Curtiss, S.W., Kolaja, K.L., Alden, C.L., Blomme, E.A.G., Curtiss, W.C., Davila, J.C., Jackson, C.J. y Bunch, R.T. (2004). Acute molecular markers of rodent hepatic carcinogenesis identified by transcription profiling. *Chemical Research Toxicology* 17: 463-470.
- (16) Colland, F. y Daviet, L. (2004). Integrating a functional proteomic approach into the target discovery process. *Biochimie* 86: 625-632.
- (17) Steiner, G., Suter, L., Boess, F., Gasser, R., de Vera, M.C., Albertini, S. y Ruepp, S. 2004. *Environmental Health Perspectives* 112. 1236-1248.