

## MEDICINA GENOMICA

## APLICACIONES DEL POLIMORFISMO DE UN NUCLEOTIDO Y MICROMATRICES DE ADN

MONICA P. SPALVIERI<sup>1</sup>, ROSA G. ROTENBERG<sup>2</sup><sup>1</sup> *Círculo Bioquímico, Distrito III de la Federación Bioquímica de la Pcia. de Buenos Aires*<sup>2</sup> *Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

**Resumen** Esta actualización tiene por objeto difundir un nuevo enfoque de las variaciones del ADN entre individuos y comentar las nuevas tecnologías para su detección. La secuenciación total del genoma humano es el comienzo para conocer la diversidad genética. La unidad de medida reconocida de esta variabilidad es el polimorfismo de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* o *SNP*). El estudio de los SNPs está restringido a la investigación pero las numerosas publicaciones sobre el tema hacen vislumbrar su entrada en la práctica clínica. Se presentan ejemplos del uso de SNPs como marcadores moleculares en la genotipificación étnica, la expresión génica de enfermedades y como potenciales blancos farmacológicos. Se comenta la técnica de las matrices (*arrays*) que facilita el estudio de múltiples secuencias de genes mediante *chips* de diseño específico. Los métodos convencionales analizan hasta un máximo de 20 genes, mientras que una sola micromatriz provee información sobre decenas de miles de genes simultáneamente con una genotipificación rápida y exacta. Los avances de la biotecnología permitirán conocer, además de la secuencia de cada gen, la frecuencia y ubicación exacta de los SNPs y su influencia en los comportamientos celulares. Si bien la validez de los resultados y la eficiencia de las micromatrices son aún controvertidos, el conocimiento y caracterización del perfil genético de un paciente impulsará seguramente un cambio radical en la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades humanas.

**Palabras clave:** SNP, polimorfismo, micromatriz, genotipificación, farmacogenómica

**Abstract** *Genomic Medicine. Polymorphisms and microarray applications.* This update shows new concepts related to the significance of DNA variations among individuals, as well as to their detection by using a new technology. The sequencing of the human genome is only the beginning of what will enable us to understand genetic diversity. The unit of DNA variability is the polymorphism of a single nucleotide (SNP). At present, studies on SNPs are restricted to basic research but the large number of papers on this subject makes feasible their entrance into clinical practice. We illustrate here the use of SNPs as molecular markers in ethnical genotyping, gene expression in some diseases and as potential targets in pharmacological response, and also introduce the technology of arrays. Microarrays experiments allow the quantification and comparison of gene expression on a large scale, at the same time, by using special chips and array designs. Conventional methods provide data from up to 20 genes, while a single microarray may provide information about thousands of them simultaneously, leading to a more rapid and accurate genotyping. Biotechnology improvements will facilitate our knowledge of each gene sequence, the frequency and exact location of SNPs and their influence on cellular behavior. Although experimental efficiency and validity of results from microarrays are still controversial, the knowledge and characterization of a patient's genetic profile will lead, undoubtedly, to advances in prevention, diagnosis, prognosis and treatment of human diseases.

**Key words:** SNP, polymorphism, microarray, genotyping, pharmacogenomics

El genoma humano contiene  $3 \times 10^9$  pares de bases y difiere de nuestro pariente cercano, el chimpancé, en aproximadamente un 1%, estableciendo una diferencia entre ambas especies que sólo involucra a 30 millones de ellas<sup>1</sup>. La variabilidad genética entre individuos o sea su

polimorfismo es aún menor, alrededor del 0.1%. Ello representa  $3 \times 10^6$  pares de bases susceptibles de presentar cambios de un solo nucleótido o el de polimorfismos múltiples. El 90% de la diversidad fenotípica humana proviene de las variaciones heredadas en una sola base o *single nucleotide polymorphism* (SNP)<sup>2</sup>. Es la menor alteración que puede experimentar la secuencia de ADN de un individuo, y se origina por el intercambio recíproco de los nucleótidos: adenina, citosina, timina o guanina. Es el más común de los polimorfismos. Si no superan el 1% de inci-

Recibido: 17-XII-2003

Aceptado: 8-VI-2004

**Dirección postal:** Dra Rosa G. Rotenberg, Zabala 2432 4° A. (1426)  
Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4758-0259

e-mail: monicaspallvieri@fibertel.com.ar

dencia son consideradas mutaciones y no polimorfismos. Ocurren aproximadamente cada 100 a 1000 bases, en cantidad variable y distribución aleatoria a lo largo del genoma humano<sup>3</sup>. Cuando se encuentran integrando exones dan lugar, en la mayoría de los casos, a proteínas con expresión, estructura o funciones biológicas alteradas y se conocen como SNPs codificantes (cSNPs). Debido a que sólo 3 a 5% del ADN humano corresponde a secuencias que codifican, la mayoría de los SNPs se localiza fuera de estas regiones. Sin embargo, aun en ausencia de significado funcional, su proximidad a un determinado gen alterado, con el que segrega en forma conjunta, lo transforma en un indicador útil para detectar potenciales anomalías génicas. Estos polimorfismos son de particular interés, y con el desarrollo de nuevas tecnologías facilitan la identificación genética.

Se presume que existen más de 5 millones de SNPs en el genoma humano y en el año 2001 fue publicado un mapa que identifica y localiza 1.42 millones de ellos<sup>4</sup>. Algunos parecen actuar como marcadores ancestrales y es previsible que muchos de ellos presenten relevancia clínica. Irizarry y col señalan 48196 SNPs candidatos que podrían ser utilizados en el mapeo de genes asociados a distintas enfermedades<sup>5</sup>.

Los SNPs actúan como improntas de nacimiento y su variedad caracteriza al grupo poblacional. Cada individuo es portador de un patrón propio de SNPs que lo identifica y que comparte con su grupo étnico. Las investigaciones están dirigidas a analizar sectores del ADN portadores de un SNP asociado al o los genes responsables de determinada anomalía, con el o los cuales co-segrega. Su identificación puede permitir establecer un registro genómico de enfermedades humanas.

La mayoría de estas enfermedades son el producto de desórdenes genómicos complejos ya que son pocos los casos en que la alteración de un solo nucleótido conduce a la enfermedad. Sin embargo, tanto si la anomalía proviene de un solo gen (monogénicas) o de varios (poligénicas), el fenotipo resultante constituye el reflejo tanto de las interacciones con otras secuencias génicas como de diversas variables epigenéticas. La evaluación de estos factores no genéticos, que incluyen cambios ambientales, dietarios y estilos de vida, permite una mejor interpretación del comportamiento génico<sup>6</sup>.

El test genético consiste en un estudio de asociación, comparando el patrón de SNPs de la población enferma, cuyo gen responsable es conocido, con el de individuos sin esa enfermedad y permite, a través de la expresión génica, identificar a la población susceptible de contraerla.

La extensión de dichos conceptos es utilizada por la farmacogenómica para establecer la eficacia de una droga<sup>4,7</sup>. Normalmente no es posible predecir la reacción del paciente a un determinado fármaco y esto ha movilizó a las empresas farmacéuticas a buscar una relación entre cambios génicos y las respuestas disímiles o

los graves efectos colaterales y adversos observados en los tratamientos. Las nuevas tecnologías genómicas permiten una mejor comprensión de las diferencias genéticas que gobiernan esta variedad de respuestas. Es por ello que la *Food and Drug Administration* (FDA) promueve la búsqueda de nuevos productos farmacéuticos basados en datos genéticos para hallar la droga más beneficiosa en cada caso, que conduzca a la terapéutica personalizada. Los SNPs pueden predecir así la eficacia y tolerancia a determinada medicación<sup>8</sup>.

Debido a que son relativamente estables genéticamente, los SNPs actúan como verdaderas señales biológicas. Su localización en zonas bien definidas del ADN permite elaborar mapas cromosómicos indicadores de su posición relativa respecto de genes conocidos y a la vez, caracterizar las interacciones con otros genes.

Analizando la información que brinda la célula normal, se inicia una nueva era tendiente a definir los sitios claves del genoma humano. Es previsible que la decodificación de los millones de cambios posibles en la secuencia de ADN, es decir sus polimorfismos, permitirá con el tiempo una genotipificación masiva. Esta ardua tarea del secuenciamiento de decenas de miles de individuos, requiere del uso de métodos eficaces para su detección, aplicables a gran número de muestras y al menor costo posible<sup>9</sup>.

Durante los últimos años el mapeo genómico de los SNPs ha sido el blanco de varias empresas de biotecnología, tales como *Incyte* (EE.UU.), *Genset* (Francia), *Celera* (EE.UU.) y *CuraGen* (EE.UU.). En abril de 1999, la unión de varias grandes compañías farmacéuticas con importantes centros de secuenciamiento del ADN dio origen a *The SNP Consortium*, la que estableció una base de datos pública de más de 300 000 SNPs en el lapso de dos años. Este evento impulsó el interés en el área y a partir de 2002, coincidente con la creación del centro de coordinación de los datos obtenidos (DCC), los SNPs identificados superaron los 1.5 millones<sup>10,11</sup>.

### SNPs del angiotensinógeno

Comparados con la población general de Canadá, los aborígenes Oji Cree de Sandy Lake, Ontario, presentan una alta prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se ha observado que estos diabéticos tienen una probabilidad siete veces mayor de desarrollar una enfermedad renal terminal, que la población diabética general canadiense<sup>12</sup>. Ello sugiere que estos individuos son portadores de algún factor distintivo que los predispone a este riesgo.

Es reconocida la frecuente asociación entre la nefropatía de la DM2 con la hipertensión arterial (HTA) y la elevación en plasma de angiotensinógeno (AGT)<sup>13</sup>.

Hegele y col hallaron en la población diabética Oji Cree una relación entre la susceptibilidad a la nefropatía y la existencia de ciertos polimorfismos. Comprobaron que uno de los determinantes de las complicaciones renales en la DM2 es el polimorfismo proteico Met235Thr del gen AGT, donde una metionina canjea por treonina, como consecuencia del reemplazo de una timina por citosina ( $T_{842} \rightarrow C$ )<sup>14</sup>. Los mismos autores detectaron variaciones en la zona promotora del gen AGT, debido a una sustitución de una guanina por una adenina ( $G_6 \rightarrow A$ )<sup>15</sup>.

Los resultados del estudio de la población Oji Cree llevan a las siguientes conclusiones: existe en ellos una alta prevalencia de las variantes 6A y T235 con una importante relación entre ambos polimorfismos; los sujetos con DM2 presentan mayor frecuencia de T235, la que a su vez está significativamente asociada a la presencia de microalbuminuria, utilizada como indicador de nefropatía temprana<sup>14, 16</sup>.

Se ha demostrado que la variante T235 y en menor grado el alelo 6A, tienen relación con el aumento de la presión sistólica en la población general. Si bien aún se desconoce el impacto aislado del alelo 6A sobre la HTA, es frecuente la segregación conjunta de ambos polimorfismos, hecho que correlacionaría la nefropatía diabética con la presión arterial en estos aborígenes. La susceptibilidad a desarrollar complicaciones renales sería aún más importante en los homocigotas T235/T235.

Aun cuando estas variaciones en el gen AGT se asocian con la predisposición a determinados fenotipos anormales, como la nefropatía diabética, es probable que requieran la presencia de un segundo factor ya sea genético o ambiental, para hacerse evidentes. La creación de las reservas indígenas provocó grandes cambios en el estilo de vida de esta comunidad nómada de la región subártica. Originariamente se alimentaban de la caza y la reducción de la actividad física con las nuevas costumbres adquiridas parece haber influido en una mayor prevalencia de la enfermedad metabólica<sup>17</sup>.

Distintos estudios realizados en la población humana y en primates sugieren que los dos SNPs analizados corresponderían a formas ancestrales del gen AGT, indicando una falta de readaptación génica a los nuevos hábitos de este grupo nativo. Según Diamond, la DM2 puede considerarse una enfermedad prevalente en poblaciones que presentan susceptibilidad genética, la que sería desenmascarada por los factores ambientales, asociados a determinados estilos de vida<sup>18</sup>.

### SNPs de la transferrina

La transferrina (TF) es la proteína circulante encargada de transportar el hierro (Fe) en el organismo. Posee la capacidad de trasladarlo desde los sitios de absorción

intestinal o de almacenamiento hacia las células específicas que lo requieren, o para integrar las reservas de Fe bajo la forma de ferritina o hemosiderina.

Si bien se han descrito variantes génicas de TF humana, es poco lo que se sabe acerca de sus diferencias funcionales. Sin embargo, el análisis de los genes involucrados en el metabolismo del Fe sugiere que determinados SNPs podrían contribuir a caracterizar tanto la predisposición a las deficiencias como a las sobrecargas de Fe en el humano<sup>19</sup>.

Kasvosve y col estudiaron selectivamente una etnia de Zimbabwe que presenta un mayor riesgo para la sobrecarga de Fe debido al consumo ritual de cierta bebida alcohólica<sup>20</sup>. El uso de recipientes de hierro sin galvanizar en la elaboración casera de la bebida contribuye a que esta población tenga la prevalencia de sobrecarga de Fe más alta del mundo. A pesar de esta costumbre tradicional, estos individuos modulan el nivel de Fe circulante mediante una adaptación de los factores genéticos involucrados, especialmente en relación con las variantes de TF presentes. Algunas investigaciones mencionan 77 potenciales SNPs para la TF pero pocos han sido validados por secuenciación del ADN correspondiente<sup>21</sup>.

Los fenotipos de TF más estudiados e identificados por electroforesis capilar, corresponden a la forma C, que es la más frecuente y las variantes B anódica y D catódica. La combinación de estos alelos origina los diferentes haplotipos de TF hallados en distintas poblaciones<sup>22</sup>. El homocigota CC es la forma casi exclusiva en los caucásicos, mientras que existe una alta frecuencia de individuos heterocigotas CD en distintas regiones de África (Zimbabwe, Ruanda, Mozambique) y algunas regiones sudamericanas. La presencia del alelo D le confiere a la TF una diferencia funcional para transportar Fe, con valores de Fe sérico, TIBC (*transferrin iron binding capacity*), saturación de TF e índice Fe sérico/TF, significativamente más bajos que los homocigotas CC. La relación Fe/TF determina la capacidad de unión del Fe a las distintas variantes de TF. Esta fracción, aislada por diálisis, indica la cantidad de Fe que puede ser unido y transportado por la proteína y ha sido confirmada por experiencias *in vitro*.

El oeste de África y la zona Bantú tienen la mayor frecuencia del alelo D y coinciden con las poblaciones de riesgo para la sobrecarga de Fe. Sin embargo, llama la atención que la población negra de EE.UU. presenta una frecuencia baja, cercana al 10%, de fenotipo CD<sup>23</sup>.

La existencia de homocigotas DD sería poco viable y desventajosa genéticamente pues impediría casi en su totalidad el transporte de Fe. La literatura informa el hallazgo de solamente un individuo con haplotipo DD, en una familia aborigen australiana.

La ausencia de homocigotas DD de TF y la diferencia de saturación entre los distintos fenotipos, aportan mu-

chas evidencias de la importancia biológica y clínica de los SNPs. En el caso de las poblaciones expuestas a una sobrecarga de Fe, originada por sus hábitos, la adaptación a través de la presencia de determinados SNPs en el gen TF, evidencia una presión génica para minimizar el transporte de Fe. Puede concluirse que estos individuos estarían protegidos por su alelo D de una acumulación perjudicial de Fe.

Con respecto al estudio de los polimorfismos de TF en otras enfermedades, publicaciones recientes involucran al SNP Cis282Tir de la TF, relacionada a la hemocromatosis, como un factor de riesgo en la enfermedad de Parkinson<sup>24</sup>.

### SNPs del citocromo P450

Los citocromos son hemoproteínas localizadas en la membrana de las mitocondrias y del retículo endoplásmico que intervienen fundamentalmente en la transferencia de electrones mediante reacciones redox reversibles. Se clasifican en cuatro familias o grupos principales: a, b, c y d, según la naturaleza de la cadena lateral de la porfirina y el tipo de enlace que une al hem. Cada familia está constituida por varias sub-familias. Una de las más estudiadas, perteneciente al grupo b, es la del citocromo P450 (**CYP**: del inglés **CY**tochrome **P**450), llamada así debido a que su máxima absorción (pico de Soret) se ubica a 450 nm.

La proteína CYP es polimórfica y posee varias isoenzimas que se caracterizan por actuar como hidroxilasas<sup>25</sup>. Una de ellas, la isoenzima debrisoquina-4-hidroxilasa conocida como CYP2D6, es responsable de la metabolización de ciertas drogas que incluyen en su estructura a la debrisoquina. Tal es el caso de numerosos neurolépticos y antidepresivos tricíclicos utilizados con frecuencia. Por otra parte se ha observado que distintas alteraciones del gen CYP estarían involucradas en la aparición de efectos colaterales, incompatibilidad y/o variación en la eficacia terapéutica de más de 30 compuestos farmacéuticos.

Se han identificado y asociado varios SNPs del CYP2D6 con alteraciones del metabolismo de debrisoquina y drogas estructuralmente relacionadas. Estos cambios genómicos son los responsables del amplio rango de actividad observado en la enzima CYP2D6: desde un metabolismo ultra-rápido hasta ausencia absoluta de acción. Los portadores homocigotas o heterocigotas de deficiencias en el alelo CYP2D6 metabolizan las drogas en baja proporción (MP: metabolizadores pobres) permitiendo una permanencia más prolongada en circulación, con mayor riesgo de efectos tóxicos. En cambio, los individuos que presentan duplicación del gen activo CYP2D6 o poseen el alelo

CYP2D6\*2 metabolizan las drogas en forma ultra-rápida, causando la falla terapéutica.

Estos hallazgos han promovido numerosos estudios poblacionales, especialmente en orientales y caucásicos. Las diferencias inter-étnicas observadas se adjudican a la azarosa distribución de los alelos de este gen en las distintas etnias.

Estudios realizados en la población china de Hong Kong determinaron una prevalencia del 54.2% para el alelo CYP2D6\*10B y del 10.5% para el CYP2D6\*10A, concluyendo que el 64.71% de la población presenta un genotipo que incluye al alelo \*10. Las variantes \*10A y \*10B estarían relacionadas con el fenotipo EM (extensión de la acción metabólica) en cuanto a la duración del efecto de la droga. Dichos alelos presentan una mutación C<sub>188</sub> → T, que causa la sustitución Pro34Ser, en el exón 1, originando una enzima inestable y poco eficaz. Mediante estudios de genotipificación masiva ha sido demostrada la variable actividad enzimática de CYP2D6, no solo a nivel racial, sino también entre distintos grupos étnicos de la misma raza.

En la población caucásica, en cambio, se observa una prevalencia cercana al 10% de los alelos \*3 y \*4 y serían los responsables del aumento del fenotipo MP. Ambos se heredan en forma autosómica recesiva, aun cuando el 75% de los alelos mutados del CYP2D6 son acaparados por el \*4. Las mutaciones más frecuentes se observan en las variantes CYP2D6\*4, \*7 y \*8 y las deleciones en los alelos \*3 y \*6<sup>26</sup>.

Es previsible que la genotipificación del gen CYP2D6 se convierta en el futuro en un estudio de rutina para optimizar la eficacia de un tratamiento terapéutico. Sin embargo es importante destacar que la variabilidad descrita en el metabolismo de las drogas es la resultante de la co-existencia de factores genéticos y ambientales, tal como se desprende al estudiar etnias con distintas ubicaciones geográficas.

Gran cantidad de drogas y carcinógenos son excretados por el organismo luego de su conversión metabólica a través de enzimas oxidativas y de conjugación. Se ha sugerido al CYP450 como un gen candidato asociado a la quimiorresistencia de diferentes tipos de tumores y también a la enfermedad de Parkinson, si bien los estudios realizados hasta el momento se limitan a la investigación<sup>27-30</sup>.

En resumen, el estado refractario a una droga puede ser detectado mediante la identificación de los SNPs relacionados con las proteínas involucradas en su metabolismo. Las variadas respuestas serían consecuencia de la presencia de polimorfismos en los genes que gobiernan su absorción, interacción, transporte, biodisponibilidad y excreción. De este modo la carga genética afectaría la toxicidad o respuesta a una misma droga en distintos individuos.

### Micromatrices de ADN

La progresiva evolución del Proyecto Genoma Humano constituye uno de los ejes centrales que impulsan el desarrollo de nuevas tecnologías moleculares. Su objetivo primordial consiste en acelerar la detección de anomalías génicas potencialmente utilizables como marcadores<sup>31</sup>. Si bien ya desde la década del 80, fueron usados exitosamente con ese fin el análisis de los polimorfismos de restricción, la hibridización, la espectroscopia de masa y la secuenciación, todos ellos constituyen métodos largos y laboriosos.

La técnica de las micromatrices, iniciada en 1995, permite estudiar simultáneamente múltiples secuencias de un gen en forma confiable y eficiente.

1) Diseño o construcción de la matriz (*array*): consiste en fijar, mediante técnica robótica, ínfimas cantidades de secuencias conocidas de ácidos nucleicos, del orden de los nanolitros, sobre plataformas adecuadas que generalmente no superan el tamaño de un portaobjeto o tarjeta. Estas colecciones de ADN o *DNA-arrays* se preparan depositando oligonucleótidos (oligoNT), ADN complementario (cADN) o ADN genómico (gADN) pre-seleccionados que luego se fijan químicamente a la fase sólida (*spotting*)<sup>32</sup>. Otros métodos construyen las secuencias de oligoNT *in situ* mediante técnicas electroquímicas o de fotolitografía, obteniéndose de ese modo los llamados *DNA-chips*, chips genéticos o *biochips*<sup>33</sup>. Genéricamente todos son denominados micromatrices o *microarrays* (MA) y pueden ser acondicionados sobre membranas, vidrios o superficies sólidas no porosas. Existen marcas registradas que utilizan bases de geles acuosos 3D, asegurando que este medio permite la máxima interacción entre las fases reactivas<sup>34</sup>. Cada uno de los soportes descritos admite distinto número de grillas y en consecuencia de zonas de reacción. La fase sólida fotolitográfica presenta la mayor capacidad: de 50 000 a 250 000 blancos posibles.

De acuerdo al tamaño de las secuencias empleadas, los MA serán de alta o baja densidad. Los primeros están preparados con cADN, pueden tener hasta varias kilobases de longitud y generalmente son los productos amplificados y generados por PCR a partir de bibliotecas de cADN o colecciones de clones<sup>33</sup>. Los de baja densidad emplean fragmentos pequeños de ADN u oligoNT cortos (20-25 bases) o largos (50-80 bases) presintetizados o de síntesis *in situ*. Algunas empresas comercializan sistemas optimizados para distintas especies: humana, rata y ratón. Otras ofrecen diseñar la matriz a pedido, construyendo el oligoNT solicitado, cuando los existentes en el comercio no cumplen con los requerimientos del investigador<sup>34</sup>.

Las matrices de ADN actúan como moldes y pueden hibridizar con los correspondientes ácidos nucleicos provenientes de cualquier material biológico adecuadamente preparado.

Actualmente es enorme la información que brinda la *web* acerca de la tecnología de los MA. Es posible acceder a protocolos para diseñarlos, al *software* para un adecuado análisis e incluso para su interpretación, a través del *High-Density Array-Pattern Interpreter* (HAPI)<sup>35</sup>.

2) Utilización de la micromatriz (*microarray*): las secuencias a analizar, que actúan como sondas, hibridizan en forma específica con las bases complementarias fijadas en el soporte y deben llevar una marca fluorescente o radioactiva antes de ser aplicadas a la superficie de la matriz. Generalmente se utilizan como sondas gADN, cADN o ARN, aunque también es posible aplicar esta nanotecnología al estudio de la expresión de proteínas.

Según los objetivos existen distintos tipos de ensayos con MA. Si se desea comparar el perfil de expresión génica de dos muestras simultáneamente, ambas serán incluidas en una misma matriz, marcándolas con radioisótopos diferentes o fluoróforos que posean distinta frecuencia para la emisión de fluorescencia, tales como las cianinas (Fig. 1a). El ARN proveniente de dos poblaciones celulares o tejidos diferentes es usado para sintetizar ADN complementario simple cadena en presencia de nucleótidos marcados: Cy3-dUTP y Cy5-dUTP. En general este tipo de ensayo emplea matrices de alta densidad y es aplicado a la comparación de patrones genéticos, donde el nivel relativo de ambos ARN puede ser determinado por la relación Cy3/Cy5 para cada gen<sup>36</sup>.

Otro tipo de diseño utiliza dos soportes construidos con la misma matriz de oligoNT: uno de ellos para analizar las distintas secuencias del ARN de la muestra problema y el otro para identificar las de cada gen del mRNA de referencia, separadamente (Fig. 1b). La doble cadena de cADN es generada mediante el uso de poli A+ ARN de diferentes tejidos o poblaciones celulares. En dicho experimento debe someterse al cADN a una segunda transcripción reversa *in vitro* para obtener el cARN, incorporando nucleótidos marcados con biotina y detectado por su unión a streptavidina<sup>36</sup>. Este modelo de ensayo es aplicable a la genotipificación, detección de SNPs, análisis de expresión de ARN o secuenciación de ADN. La matriz puede ser diseñada con parte de un transcripto, permitiendo la búsqueda de genes relacionados o variantes de corte y empalme (*splicing*).

La hibridización sólo se llevará a cabo en el sitio exacto del MA donde el ADN u oligoNT adherido al soporte es reconocido por el cADN o cARN problema.

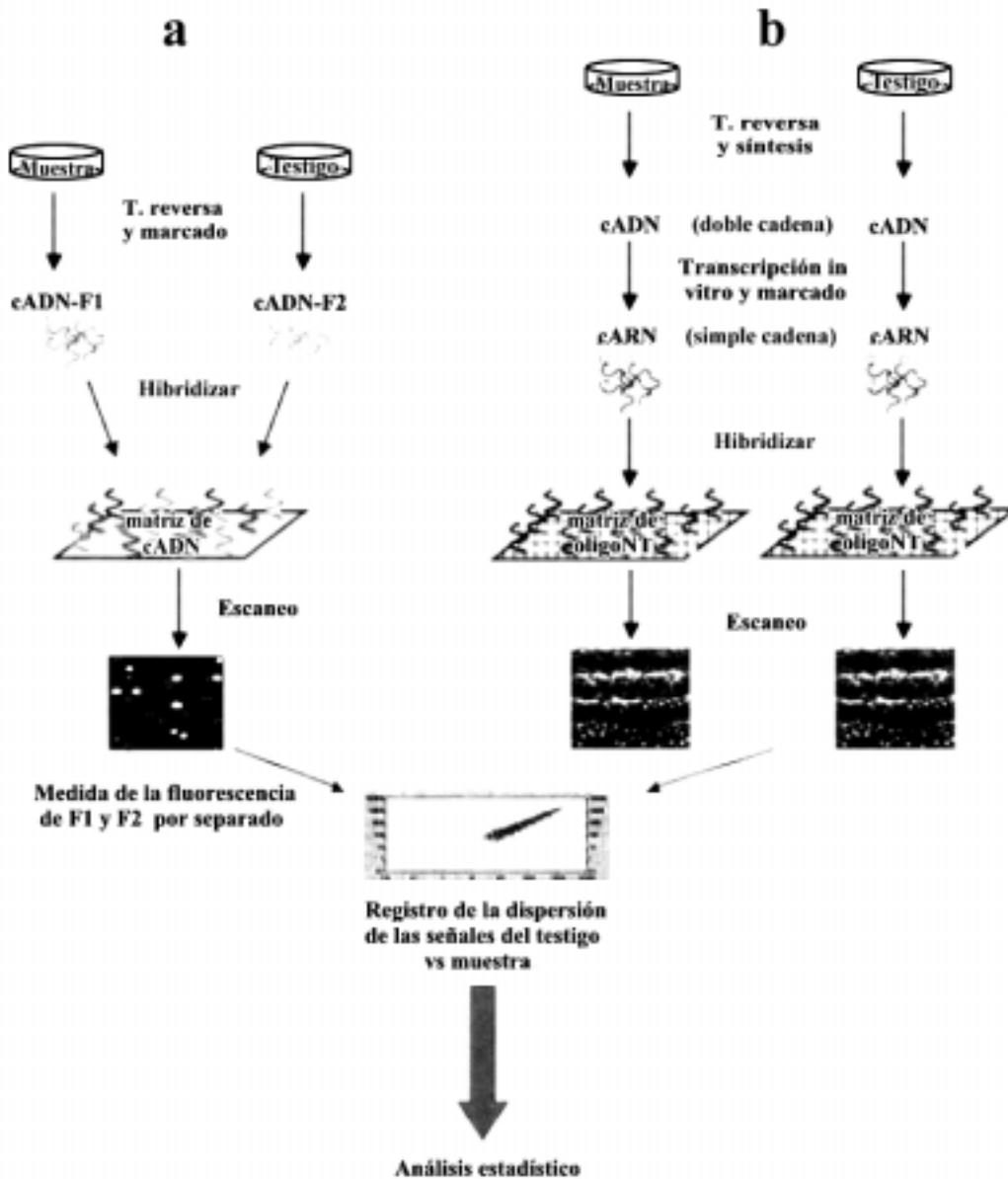


Fig. 1.— Esquema de la utilización de las matrices con ARN proveniente de muestras y testigos, realizando una o dos transcripciones reversas según el tipo de matriz empleada. Las señales fluorescentes derivadas del impacto láser son *escaneadas* y analizadas mediante sistemas de bioinformática y estadística<sup>36</sup>.

F1 (Cy3) y F2 (Cy5): distintas señales fluorescentes provenientes de cada una de las cadenas simples de cADN obtenidas por transcripción reversa del ARN a analizar.

a) Ensayo con dos señales fluorescentes provenientes de una matriz.

b) Ensayo con una sola señal.

## Aplicaciones

### a. Tipificación molecular de enfermedades

La identificación de genes clínicamente relevantes ya permite redefinir muchas enfermedades en función de la relación genotipo-fenotipo. Es factible que esta novel clasificación molecular-genética de la enfermedad establezca ca-

tegorías sólo basadas en la modulación de genes individuales, que actuarían además como factores predictivos, permitiendo un mejor abordaje terapéutico en cada caso<sup>37</sup>. Este aspecto posee una inminente aplicación en el campo de la oncología: la existencia de una especie de "firma transcripcional" que actuaría como impresión digital, estableciendo la contribución de ciertos genes propios al estado de salud o al riesgo de contraer cáncer<sup>38-40</sup>.

### b. Diagnóstico, evolución y pronóstico

La posibilidad de co-hibridizar dos muestras biológicas diferentes en una misma matriz permite la comparación conjunta de un material de referencia. De este modo se reduce la variabilidad y es posible comparar tejidos sanos *versus* sus contrapartidas tumorales u observar las diferencias en la expresión génica antes y después de un tratamiento<sup>40, 41</sup>. Ciertos subgrupos de genes permitirían identificar estadios iniciales u avanzados y otros estarían asociados a la sensibilidad de los pacientes frente a la quimioterapia<sup>41-43</sup>.

La tecnología de los MA ha sido aplicada al estudio de tumores sólidos como asimismo en oncohematología<sup>42-44</sup>. Las investigaciones se orientan hacia la expresión y funcionalidad génica en la definición de subtipos clínicos e histopatológicos, la agresividad tumoral, la existencia de enfermedad mínima residual, la respuesta al tratamiento y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos<sup>45-47</sup>. Dichos enfoques permiten ampliar los conocimientos sobre la evolución y pronóstico de ciertas neoplasias.

### c. Esclarecimiento de mecanismos moleculares

Algunos ensayos con MA se basan en los mecanismos básicos reconocidos del desarrollo tumoral posibilitando una aplicación clínica inmediata en oncología. Un ejemplo es el diagnóstico temprano del carcinoma de colon a través de la detección de K-ras mutado en las células epiteliales gastrointestinales descamadas y eliminadas por las heces. Consiste en un test de hibridización con un MA diseñado para las diez mutaciones más frecuentes de los codones 12 y 13 de dicho oncogen<sup>48</sup>.

También se ha desarrollado un MA de baja densidad para discriminar los genes responsables que codifican para 12 tipos de MAGE-A. Estos antígenos son compartidos por varias clases de tumores y poseen particular interés en la inmunoterapia antitumoral<sup>49</sup>.

Es cada vez más frecuente el uso de MA para explorar genes moduladores de diversos procesos biológicos. Así, han sido estudiados los cambios en las células endoteliales por diversas noxas, en especial en relación con la patogénesis de la aterosclerosis, la desregulación de genes pro y anti-apoptóticos en la aparición de lesiones cutáneas del lupus eritematoso, la alteración de componentes de la matriz extracelular en la cardiomiopatía hipertrófica o la resistencia al tratamiento del neuroblastoma infantil, a través del incremento de la inestabilidad genómica y de la muerte celular por apoptosis<sup>50-53</sup>.

Abundan las publicaciones que utilizan MA en el estudio de enfermedades de variada etiología, todas abocadas a identificar los SNPs o mutaciones involucrados en mecanismos como el estrés oxidativo, procesos inflamatorios e infecciosos, rechazos de trasplantes, en-

fermedades degenerativas o en la búsqueda de nuevas modalidades terapéuticas<sup>54</sup>.

Es poco claro aún el rol que desempeñan los polimorfismos hallados en el gen *parkin*, aunque la literatura refiere la mayor relación de alguno de ellos con el Parkinson familiar. Lucking y col detectaron una significativa asociación del homocigota Asp394Asn con la forma heredada y una mayor frecuencia de homocigotas Val380Leu en los casos esporádicos. También analizan algunos genes relacionados al metabolismo del hierro y observan que sólo el cambio Gly258Ser de la transferrina incide en el desarrollo de la enfermedad<sup>55, 56</sup>.

Se ha demostrado que el alelo *epsilon4* de la apolipoproteína E (apoE4) es un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. El predominio de la isoforma E4 sobre la E3 promueve el depósito cerebral de péptidos beta-amiloideos, responsables del progresivo déficit sináptico-colinérgico. Investigaciones recientes sugieren la importancia de ciertos polimorfismos existentes en el promotor del gen apoE, los que afectarían su transcripción<sup>57</sup>. La identificación de los portadores de este alelo permitirá un mejor conocimiento de la relación genotipo-fenotipo en los casos de demencia precoz familiar, posibilitando una intervención temprana.

Con MA se ha identificado la cepa de *Escherichia coli* responsable de los cuadros más frecuentes de enterohemorragias generadas por estas bacterias. Esta tecnología suministra una herramienta genómica en la diferenciación de las infecciones causadas por la familia de *E. coli* y puede conducir tanto al hallazgo de nuevos antibióticos para combatirlos como la fabricación de vacunas<sup>58</sup>.

La detección de anticuerpos circulantes para *Toxoplasma gondii*, rubéola, citomegalovirus y herpes simplex tipo 1 y 2 ha sido posible a través de los MA sembrados con las proteínas de los respectivos antígenos microbianos<sup>59</sup>.

### d. Desarrollo de tissue microarrays (TMA)

Aplicados al estudio del material de biopsias permiten definir la localización celular y la expresión génica *in situ* en forma rápida y con ahorro del espécimen necesario. Amplían el conocimiento de la prevalencia y significado clínico de muchos genes candidatos. La mayor información de los TMA proviene de su uso en oncología y ya se comercializan *DNA-chips*, de marca registrada, que incluyen diferentes subtipos histológicos y con variados grados de diferenciación de un determinado tumor. La complementación con técnicas de inmunohistoquímica o de hibridización *in situ* permite, por comparación, correlacionar la expresión génica del tejido problema con muestras de tejido normal, neoplásico y en diferentes estadios del desarrollo tumoral<sup>60-62</sup>.

### e. Mecanismos farmacológicos y blancos terapéuticos

Es posible aplicar los MA en la comparación de muestras biológicas con distintos tratamientos y a diferentes concentraciones del compuesto activo. Ello permite no sólo predecir la sensibilidad a ciertos fármacos sino establecer una eventual progresiva resistencia, suministrando nuevas estrategias diagnósticas<sup>63</sup>. El tratamiento "a medida", basado en el perfil transcripcional de cada paciente, facilitará nuevas formas de encarar la terapia y la prevención y redundará en mejores resultados, con mayor sobrevida.

### f. Teorías sobre la evolución

El reconocimiento de los genes embrionarios y jerárquicos que marcan los diferentes caminos biológicos, permitirá comprender a fondo el complejo mecanismo de los estadios de diferenciación celular<sup>64</sup>. Caracterizar esos genes ancestrales definirá si las variaciones halladas en el ADN son consecuencia de la acumulación de errores durante la evolución o, por el contrario, responden a la adaptación de la especie a su hábitat natural con el fin de asegurar la supervivencia. Es indudable que los MA ayudarán al esclarecimiento de la organización genómica y la relación evolutiva entre los distintos organismos<sup>65, 66</sup>.

Si bien la técnica de los MA complementa el proyecto de secuenciación total del genoma humano, la avalancha de datos publicados con esta nueva metodología obliga a extremar las precauciones para su interpretación. Uno de los factores limitantes es la fluctuación de resultados obtenidos con diferentes matrices diseñadas con el mismo fin. Generalmente ello ocurre por una selección inadecuada del número de replicados y el déficit en el análisis estadístico para discriminar el "ruido de base" de mínimas variaciones en la expresión génica. Los expertos consideran previsible estas diferencias por lo reciente y cambiante de esta novedosa tecnología y se esfuerzan en afinar los métodos estadísticos para la interpretación de los resultados. Para ello se reúne desde hace cuatro años el comité *Critical Assessment of Microarray Data Analysis* (CAMDA). Dada la complejidad del método, algunas revistas requieren para sus publicaciones, a partir de diciembre de 2002, el cumplimiento de ciertas pautas establecidas por la *Microarray Gene Expression Data Society*, en las normas MIAME (minimum information about a microarray experiment). Estas incluyen directivas específicas relacionadas al diseño experimental, cantidad de replicados a procesar y adecuados análisis bioestadísticos<sup>67</sup>.

Por otra parte, no pueden ser ignorados los aspectos sociales, éticos y legales de sus posibles hallazgos, y varios grupos están abocados a evaluar y definir las reglas prácticas de este nuevo tipo de estudio clínico-

genómico a fin de establecer sus futuras implicancias<sup>68, 69</sup>.

El reciente proyecto *Hap-Map* (mapa de haplotipos) añade un nuevo esfuerzo a la investigación genómica. La tarea es titánica y consiste en efectuar estudios de asociación, comparando secuencias del ADN obtenido de gran cantidad de individuos con diferentes ubicaciones geográficas. Se espera completarlo en tres años y ya son previsible numerosos litigios sobre su patentamiento<sup>70</sup>.

En conclusión: Los avances tecnológicos de la última década han impulsado cambios revolucionarios en el campo de la biología molecular. Miles de genes requieren una adecuada investigación para determinar su papel en el delicado equilibrio salud-enfermedad.

Así como hoy usamos la historia familiar y la determinación del colesterol para predecir el riesgo de una coronariopatía, los tests de polimorfismos permitirán una adecuada prevención basada en las improntas génicas propias de una gran gama de enfermedades, posibilitando una intervención precoz.

La profundización en el estudio de la variabilidad genética nos introduce en los albores de una nueva medicina. Sin embargo, abundan las polémicas sobre la violación de la privacidad genética, la diseminación de la información y su posible utilización con fines discriminatorios. La ética debe evitar que un individuo marcado por un determinado perfil genético sea marginado y excluido de la sociedad.

Es previsible que las micromatrices se apliquen también en otros campos. En el área de la agricultura, la identificación de determinados SNPs permitirá asociarlos con atributos de relevancia, como su valor nutricional, el poder quimiopreventivo en el desarrollo de ciertas enfermedades y la resistencia a plagas o sequías con el objeto de mejorar las cosechas. La información es brindada en la *web* a través del *Access To Global Online Research in Agriculture* (AGORA).

## Bibliografía

1. Hellmann I, Zollner S, Enard W, Ebersberger I, Nickel B, Paabo S. Selection on human genes as revealed by comparisons to chimpanzee cDNA. *Genome Res* 2003; 13: 831-7.
2. Taillon Miller P, Piernot EE, Kwok PY. Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. *Genome Res* 1999; 9: 499-505.
3. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al. Large-scale identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280: 1077-82.
4. Gould-Rothberg BE. Mapping a role for SNPs in drug development. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 209-11.
5. Irizarry K, Kustanovich V, Li C, Brown N, et al. Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nat Genet* 2000; 26: 233-6.

6. Kayser M, Brauer S, Stoneking M. A genome scan to detect candidate regions influenced by local natural selection in human populations. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 893-900.
7. Campbell D, Valdes AM, Spurr N. Making drug discovery a SN(i)P. *Drug Discov Today* 2000; 5: 388-96.
8. Pfost DR, Boyce-Jacino MT, Grant DM. A SNPshot: pharmacogenetics and the future of drug therapy. *Trends in Biotechnology* 2000; 18: 334-8.
9. Tillib SV, Mirzabekov AD. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Current Opinion in Biotechnology* 2001; 12: 53-8.
10. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucl Ac Res* 2001; 29: 308-11.
11. Thorisson GA, Stein LD. The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucl Ac Res* 2003; 31: 124-7.
12. Young TK, Kaufert J.M., McKenae JK, Hawkins A, O'Neil J. Excessive burden of end-state renal disease among Canadian Indians: a national survey. *Am J Public Health* 1989; 79: 756-8.
13. Ishikawa K, Baba S, Katsuya T, et al. T+31C polymorphism of angiotensinogen gene and essential hypertension. *Hypertension* 2001; 37: 281-5.
14. Hegele R, Harris S, Hanley A, Zinman B. Association between AGT T235 variant and microalbuminuria in Canadian Oji Cree with type 2 DM. *Clin Biochem* 1999; 32: 201-5.
15. Hegele RA, Harris SB, Harley AJ, Sun F, Connely PW, Zinman B: 6A promoter variant of angiotensinogen and blood pressure variations in Canadian Oji-Cree. *J Hum Genet* 1998; 43: 37-41.
16. Freire MB, Ji L, Onuma T, Orban T, Warran JH, Krolewski AS. Gender-specific association of M235T polymorphism in angiotensinogen gene and diabetic nephropathy in NIDDM. *Hypertension* 1998; 31: 896-9.
17. Hegele R, Zinman B, Hanley AJG, Harris SB, Barrett PH, Cao H: Genes, environment and Oji-Cree type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2003; 36: 163-70.
18. Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003; 423: 599-602.
19. Douabin-Gicquel V, Soriano N, Ferran H, et al. Identification of 96 single nucleotide polymorphisms genes involved in iron metabolism: efficiency of bioinformatic extraction compared with a systematic sequencing approach. *Hum Genet* 2001; 109: 393-401.
20. Kasvosve I, Delanghe J, Gomo Z, et al. Transferrin polymorphism influences iron status in blacks. *Clin Chem* 2000; 46: 1535-9.
21. Lee PL, Halloran C, Beutler E. Polymorphisms in the transferrin 5' flanking region associated with differences in total iron binding capacity: possible implications in iron homeostasis. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 539-48.
22. Beckman G, Beckman L, Sikström C. Transferrin C subtypes in various ethnic groups. *Hereditas* 1980; 92: 189-92.
23. Kasvosve I, Delanghe J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 1014-8.
24. Buchanan DD, Silburn PA, Chalk JB, Le Couteur DG, Mellick GD. The Cys282Tyr polymorphism in the HFE gene in Australian Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters* 2002; 327: 91-4.
25. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Bioenergetics and metabolism. In: *Principles of Biochemistry*, Worth (ed), 3rd ed, 2000, p 782-3.
26. Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoelt A, Stüber F. Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping. *Clin Chem* 2002; 48: 1412-7.
27. Bertilsson L: Geographical/ interracial differences in polymorphic drug oxidation. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 192-209.
28. Kaye CM, Nicholls B. Clinical pharmacokinetics of ropinirole. *Clin Pharmacokinet* 2000; 39: 243-54.
29. Sapone A, Affatato A, Canistro D, et al. Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat Res* 2003; 527: 67-80.
30. El-Rayes BF, Ali S, Heilbrun LK, et al. Cytochrome p450 and glutathione transferase expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1705-9.
31. Dennis C. Special section on human genetics. The rough guide to the genome. *Nature* 2003; 425: 758-9.
32. Okamoto T, Suzuki T, Yamamoto N. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 438-41.
33. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lohkhar DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; 21: 20-4.
34. Tan PK, Downey TJ, Spitznagel EL, et al. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucl Ac Res* 2003; 31: 5676-84.
35. UCSD School of Medicine. Array Science. <http://www.array.ucsd.edu/hapi/>
36. Schultze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays- a technology review. *Nature Cell Biology* 2001; 3: 190-5.
37. Liefers GJ, Tollenaar RA. Cancer genetics and their application to individualized medicine. *Eur J Cancer* 2002; 38: 872-9.
38. Su AL, Welsh JB, Sapinoso LM, et al. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 2001; 61: 7388-93.
39. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1170-7.
40. Lynch HT, de la Chapelle A. Genomic medicine: hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.
41. Bayani J, Brenton JD, Macgregor PF, et al. Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization and expression microarrays. *Cancer Res* 2002; 62: 3466-76.
42. Shridhar V, Sen A, Chien J, et al. Identification of underexpressed genes in early and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res* 2002; 62: 262-70.
43. Chu LW, Troncso P, Johnston DA, Liang JC. Genetic markers useful for distinguishing between organ-confined and locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 303-12.
44. Okutsu J, Tsunoda T, Kaneta Y, et al. Prediction of chemosensitivity for patients with acute myeloid leukemia, according to expression levels of 28 genes selected by genome-wide complementary microarray analysis. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 1035-42.
45. Luo J, Duggan DJ, Chen Y, et al. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* 2001; 61: 4683-8.
46. Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, et al. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarrays analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res* 2001; 61: 6474-9.

47. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97: 2115-20.
48. Prix L, Uciechowski P, Böckmann B, Giesing M, Schuetz AJ. Diagnostic biochip array for fast and sensitive detection of K-ras mutations in stool. *Clin Chem* 2002; 48: 428-35.
49. Zammateo N, Lockman L, Brasseur F, et al. DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem* 2002; 48: 25-34.
50. Keyhan G, Jennifer R, Wang J, Miller D, McManus R, Hegele R. Gene-drug interaction: additive influence of mutant APOA1 and testosterone on plasma HDL-Cholesterol. *Clin Biochem* 2002; 35: 341-6.
51. Baima B, Sticherling M. Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2001; 144: 958-66.
52. Hwang JJ, Allen PD, Tseng GC, et al. Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. *Physiol Genomics* 2002; 10: 31-44.
53. Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 2001; 61: 6185-93.
54. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; 349: 125-38.
55. Lucking CB, Chesneau V, Lohmann E, et al. Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2003; 60: 1253-6.
56. Borie C, Gasparini F, Verpillat P, et al. French Parkinson's disease genetic study group. Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J Neurol* 2002; 249: 801-4.
57. Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology* 2003; 60: 246-52.
58. Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, et al. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 2003; 185: 1831-40.
59. Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious disease. *Clin Chem* 2002; 48: 121-30.
60. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 2003; 162: 469-77.
61. Zhang D, Salto-Tellez M, Do E, Putti TC, Koay ES. Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Hum Pathol* 2003; 34: 362-8.
62. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 312-9.
63. Melton L. Pharmacogenetics and genotyping: on the trail of SNPs. *Nature* 2003; 422: 917, 919, 921, 923.
64. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res* 2003; 526: 53-61. Review.
65. Zhao Z, Fu YX, Hewett-Emmett D, Boerwinkle E. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene* 2003; 312: 207-13.
66. Clark AG, Nielsen R, Signorovitch J, et al. Linkage disequilibrium and inference of ancestral recombination in 538 single-nucleotide polymorphism clusters across the human genome. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 285-300.
67. Claire Tilstone. DNA microarrays: Vital statistics. *Nature* 2003; 424: 610-2.
68. Friedrich MJ. Preserving privacy, preventing discrimination becomes the province of genetics experts. *JAMA* 2002; 288: 815-6, 819.
69. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS; US National Genome Research Institute: A vision for the future of genomics research. *Nature* 2003; 422: 835-47.
70. Barton JH. Patents, genomics, research, and diagnostics. *Acad Med* 2002; 77(12 Pt 2): 1339-47.

-----

## II

Para dialogar,  
preguntad, primero:  
después. . . escuchad

Antonio Machado (1875-1938)

*Nuevas Canciones (1917-1930). CLXI.-Proverbios y cantares.*

En: *Poesías*. Buenos Aies: Losada, 1995, p 213