

# El largo camino hacia la secuenciación del genoma humano: de los guisantes de Mendel a los escopetazos de Venter. Impacto en el conocimiento de las enfermedades cardiovasculares

M. Pocoví\* y F. Civeira\*\*

\*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. \*\*Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Zaragoza.

---

Recientemente han sido publicados en *Science* y en *Nature*<sup>1,2</sup> los resultados de la secuenciación del genoma humano, con un amplio eco en los medios de comunicación. Ello ha desatado una gran euforia en la sociedad tras las falsas promesas realizadas por algunos científicos y fomentadas por la prensa en el sentido de que en el futuro desaparecerán las enfermedades hereditarias y que se dispondrá de herramientas para curar todo tipo de enfermedades que abarcan desde la fibrosis quística a las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, las cosas no son tan sencillas; por una parte, el genoma humano es altamente heterogéneo, el conocimiento que se dispone del mismo es todavía incompleto y hay un gran número de factores ambientales que modifican el fenotipo. El progreso científico que ha permitido este avance en el conocimiento del genoma humano empezó en el siglo XIX y progresó paso a paso a lo largo de todo el siglo XX.

## Las matemáticas, Mendel y sus experimentos olvidados

El monje austríaco Gregor Mendel nacido en Brno, ciudad que actualmente pertenece a la Repú-

blica Checa, fue quien descubrió las leyes de la herencia. Mendel realizó sus experimentos con la planta del guisante de jardín, *Pisum sativum*, observando que las características heredadas eran discontinuas, es decir, discretas y constantes: los guisantes heredaban características bien definidas, sus semillas eran verdes o amarillas, rugosas o lisas<sup>3</sup>. Con anterioridad a sus descubrimientos, los biólogos estaban inmersos en la teoría evolutiva de Charles Darwin e intentaban dar explicación a las características hereditarias mediante pequeños cambios de los caracteres que iban a producir una variación continua. Durante largo tiempo se tuvo la creencia que la herencia era un proceso de mezcla y que los descendientes diluían las características paternas.

Mendel trabajó con un número grande de descendientes y convirtió sus resultados en proporciones, describiendo sus experimentos en 1865, con una claridad extraordinaria. Sin embargo, sus contemporáneos practicaban en aquella época una ciencia muy descriptiva y no estaban familiarizados con la aplicación de las matemáticas a la biología. Por otra parte, no se había descrito ningún elemento físico con el que las partículas hereditarias de Mendel pudieran identificarse y, por tanto, sus experimentos fueron totalmente olvidados. Las conclusiones de Mendel no fueron redescubiertas y aceptadas hasta principios de 1900, época en que ya se habían descubierto los cromosomas, sus movimientos durante la división de la célula y su papel como transportadores de las unidades hereditarias. Por otra parte, los biólogos a principios del

---

Correspondencia: Dr. M. Pocoví.  
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular.  
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.  
50009 Zaragoza.

*Palabras clave:*  
Enfermedad cardiovascular. Genoma humano.

siglo xx ya estaban mejor preparados para manejar las matemáticas de lo que lo estaban en tiempos de Mendel. De este modo, se aceptaba que existía un material hereditario, compuesto de genes que se encuentran en los cromosomas y que su comportamiento en la transmisión puede predecirse aplicando métodos estadísticos.

### **Garrod: el descubridor de la genética humana**

Puede afirmarse que la genética molecular humana tuvo su inicio hace más de 100 años con los descubrimientos realizados por el médico británico Sir Archibald Garrod. Estudiando enfermedades poco frecuentes de la especie humana observó que determinadas enfermedades que se manifiestan por anomalías metabólicas se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel. Garrod, para distinguirlas de otras enfermedades, las denominó "errores congénitos del metabolismo"<sup>4</sup>. Desgraciadamente, la obra de Garrod no despertó la atención que se merecía por parte de los investigadores en genética y el avance del conocimiento en este campo fue relativamente lento en la primera mitad del siglo xx.

### **Identificación del ADN como material genético**

La identificación del material genético con el ácido desoxirribonucleico (ADN) se basó fundamentalmente en la observación de que es posible transmitir características hereditarias de una célula a otra mediante la transferencia de ADN. El primer paso lo dio Fred Griffith en 1928 con el descubrimiento de la transformación en bacterias. Griffith utilizó en sus experimentos el *Streptococcus pneumoniae*<sup>5</sup>. Esta bacteria es la que produce la neumonía en humanos y es muy patógena para el ratón, provocándole una septicemia que mata al animal en menos de 24 h. Griffith descubrió que una cepa de esta bacteria no patógena podía ser transformada en patógena por una sustancia que denominó "principio transformante". Sin embargo, el principio transformante no fue identificado como el ADN hasta 1944 por el grupo formado por Oswald Avery, Collin McLeod y Maclyn McCarty<sup>6</sup>. Este descubrimiento fue un hito en el desarrollo de la genética, ya que hasta esa fecha se consideraba que las proteínas eran las portadoras de la información genética. El papel del ADN como material genético universal fue posteriormente confirmado en 1952 por Alfred Hershey y Martha Chase mediante estudios con virus que infectan a la bacteria *Escherichia coli*. Estos investigadores demostraron que únicamente el ADN del virus penetra dentro de la célula y, por tanto, el ADN constituye el único elemento de continuidad genética<sup>7</sup>.

Las primeras indicaciones de que el ADN era el material genético fueron acogidas con gran escepticismo, ya que el ADN por análisis químico había revelado que estaba formado sólo por cuatro unidades (bases) que se repetían. Esta estructura era incompatible con el papel del ADN como portador de la información genética porque era un polímero regular y esta repetición monótona no se creía que pudiera contener información genética. Gracias a las aportaciones de James Watson y Francis Crick, en 1953 se comprobó que el ADN tenía una estructura más interesante de lo que se había imaginado<sup>8</sup>. El modelo estructural sugerido por estos dos investigadores de Cambridge fue, tal vez, por encima de las indicaciones experimentales, la prueba más convincente de que el ADN era, efectivamente, el material genético. Dos descubrimientos previos fueron los que llevaron a Watson y Crick a diseñar un modelo correcto para la molécula del ADN. Por una parte, Erwin Chargaff había demostrado que en las diferentes especies sólo cuatro bases componen la estructura de los ácidos nucleicos y que éstas estaban en proporciones que sugerían apareamiento. Y, por otra, Maurice Wilkins y Rosalind Franklin habían obtenido el patrón de difracción de rayos X de la molécula del ADN. Este descubrimiento y otros que le siguieron permitieron conocer que el ADN tiene dos funciones. Una consistente en proporcionar la información genética que conlleva las características de cada individuo. La otra función del ADN es su propia replicación sirviendo de molde para convertir un organismo en otro.

### **El código genético y el descubrimiento de las herramientas para manipular el ADN**

A partir del descubrimiento de Watson y Crick, el avance del conocimiento de los procesos relacionados con la bioquímica de la transmisión genética fue verdaderamente vertiginoso y resulta imposible hacer aquí referencia de cada uno de ellos. Cabe, sin embargo, citar alguno de ellos: el desciframiento del código genético llevado a cabo por Severo Ochoa, Gobind Khorana, Marshall Nirenberg y Phillip Leder y los mecanismos de la regulación genética demostrada por los científicos franceses Françoise Jacob y Jacques Monod<sup>9-11</sup>. Sin embargo, lo más destacable de la segunda mitad de siglo ha sido, sin género de dudas, el rápido desarrollo tecnológico que se ha producido en el campo de la bioquímica y biología molecular, que ha proporcionando toda una serie de herramientas que permiten manipular el material genético a voluntad de los investigadores: cortar (enzimas de restricción) y

pegar trozos de ADN (ADN ligasas), secuenciar, expresar genes y estudiar su regulación, producir copias idénticas de ADN, clonar microorganismos y animales superiores.

Uno de los avances más espectaculares tuvo lugar a final de los años setenta con el descubrimiento realizado por Frederick Sanger en Inglaterra y Allan Maxam y Walter Gilbert en los EE.UU. con la lectura de la información que hay en los genes. Sanger describió un método de secuenciación basado en la interrupción controlada de la síntesis enzimática del ADN y Maxam y Gilbert un método basado en la degradación química controlada en cada una de las 4 bases<sup>12,13</sup>. Entre 1977 y 1982, combinando la técnica de secuenciación de pequeños fragmentos de ADN y los mapas conseguidos con las enzimas de restricción, se consiguió secuenciar el genoma completo del virus bacteriano  $\phi$ X174, el fago  $\lambda$ , el virus animal SV40 y el ADN mitocondrial humano. Estos avances demostraron que era posible el ensamblar pequeños fragmentos de ADN en genomas completos.

En 1986, Hood et al mejoraron el método de secuenciación uniendo a los nucleótidos colorantes fluorescentes que facilitan la lectura secuencial. Un año más tarde, la compañía Applied Biosystems obtuvo la primera secuencia utilizando estos compuestos fluorescentes. Otro hallazgo importante fue el hecho de que los ARNm de una célula o tejido pueden ser transformados en ADN (cADN) y conocer su secuencia, lo que constituye la base del método denominado *expressed sequence tag* (EST) utilizado para la identificación de genes. El método EST permite el descubrimiento y mapeado de los genes humanos. Programas predictores de genes permiten ver cómo se traducen las secuencias de exones en proteínas. El aumento espectacular de las secuencias EST permitió el desarrollo, por The Institute for Genomic Research, de un algoritmo que sirvió para identificar zonas del ADN que codifican proteínas.

### El proyecto Genoma Humano

La idea de secuenciar el genoma humano surgió en 1984 durante el transcurso de una reunión organizada por el Departamento de Energía de los EE.UU. En 1988, un comité, el US National Research Council, emitió un informe en el que se recomendaba el obtener el mapa físico y la secuenciación del genoma humano; a su vez y de forma paralela se proponía dedicar esfuerzos en secuenciar otros organismos modelo: bacterias, levadura, gusano, mosca y ratón. Sin embargo, este proyecto presentaba varios inconvenientes: era tremenda-

mente laborioso, se calculaba que tendría un período de elaboración de 15 años. Existía el inconveniente de que no es posible secuenciar fragmentos de ADN más allá de las 800-1.000 pares de bases (pb) y había que secuenciar 3.000 millones de pb. Por tanto, era necesario fragmentar esta gran cantidad de ADN en trozos pequeños, secuenciarlos y conocer la posición que ocupan. Lo más lógico era empezar mapeando el genoma mediante: obtención de fragmentos grandes por digestión, clonarlos en vectores apropiados, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o de levadura (YAC), caracterizarlos parcialmente mediante la secuenciación de sus extremos y conocer el mapa de restricción que permitiera ensamblarlos. En una etapa posterior se debía continuar troceando estos fragmentos en otros más pequeños y clonarlos en plásmidos para facilitar su secuenciación completa y, finalmente, ensamblar estos fragmentos para reconstruir los fragmentos grandes. Además, se requería disponer de financiación suficiente, de personal adecuado y de la tecnología apropiada. En 1990 se crea el Consorcio (Human Genome Project) cuyo principal objetivo era la secuenciación del genoma humano. Este consorcio estaba formado por 20 grupos de los EE.UU., Francia, Inglaterra, Alemania y Japón, a los que se uniría en una etapa posterior China.

### Secuenciación a escopetazos *shotgun*

En 1982 Frederick Sanger secuenció el bacteriófago  $\lambda$  utilizando el procedimiento de trocear su genoma, clonar los fragmentos resultantes y ensamblarlos de nuevo según el mapa de restricción. Este procedimiento se denominó *shotgun restriction digest*. Poco después, Putney et al utilizaron una técnica que denominaron *shotgun* para analizar la secuencia de proteínas musculares<sup>14</sup>. Este método consiste en cortar el ADN que se desea secuenciar en múltiples fragmentos al azar de tamaño pequeño que permita su clonación en plásmidos y su posterior secuenciación. Una vez secuenciados se ensamban de tal forma que las secuencia de los extremos sean coincidentes.

En 1991 se planteó secuenciar por este método el genoma completo de un virus de la viruela; sin embargo, se descartó porque no se disponía de herramientas informáticas con capacidad suficiente para ensamblar los fragmentos resultantes. Tres años más tarde, el Institute for Genomic Research reconsidera la secuenciación *shotgun* cuando se propone secuenciar el microbio *Haemophilus influenzae* haciendo uso del ensamblaje de fragmentos y el algoritmo de los EST. Utilizando esta tecno-

logía, en tan solo un año de trabajo se consigue la secuencia completa de este genoma. Entre los años 1995-1997 otros proyectos utilizaron esta técnica de secuenciación.

### Cambio de planes en el proyecto

En 1998 el proyecto Genoma Humano del Consorcio Público sólo había conseguido secuenciar un 5% del genoma utilizando el sistema de mapeado previo, clonación de fragmentos grandes y subclonación en fragmentos mas pequeños. Era evidente que el avance en la secuenciación iba muy lento y el conseguir finalizar el proyecto en el año 2005 resultaba dudoso. Este mismo año, la empresa Perkin Elmer Biosystems desarrolló un secuenciador automático basado en la electroforesis capilar y marcaje con compuestos fluorescentes, el ABI PRISM 3700 DNA Analyzer. La posibilidad de utilizar fluorocromos excitados por un láser facilitó la automatización. El Consorcio y Perkin-Elmer Biosystems establecieron un convenio en vistas a la utilización del secuenciador 3700 para avanzar de forma más rápida en el proyecto. En esta época surgió una polémica de si era posible aplicar la técnica de secuenciación *shotgun* que había sido utilizada para secuenciar el genoma de *H. influenzae* al genoma humano. El principal problema surgía por el hecho de que el genoma humano es 150 veces más grande que el del microbio y, además, presenta el inconveniente de que tiene un gran número de repeticiones, lo que dificulta el ensamblaje de fragmentos pequeños.

### Dos proyectos en paralelo y la misma meta

Celera Genomics, empresa de biotecnología dirigida por Craig Venter con una alta capacidad económica e infraestructura, decidió abordar el proyecto utilizando la técnica de *shotgun*. Para ello realizó un estudio piloto secuenciando el genoma de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, utilizando esta técnica y los algoritmos de ensamblaje. Este proyecto piloto permitió conocer que era posible secuenciar un genoma de 120 millones de bases (120 Mb) por este procedimiento, ya que en tan sólo un año consiguieron secuenciar y ensamblar el genoma de la *D. melanogaster*.

La estrategia utilizada en el proyecto genoma de Celera consistió en: a) realizar la secuenciación completa del genoma a escopetazos *shotgun* de forma que por término medio cada fragmento fuera analizado 5 veces; b) utilizar los datos de las secuencias publicadas de los fragmentos largos clonados en BAC del Proyecto Genoma del Consorcio Público, que no estaban ordenados ni orientados,

con objeto de acelerar el proyecto, y c) no realizar publicaciones parciales de los datos conseguidos. Esta estrategia tiene el inconveniente de que es menos precisa, pero la ventaja de que es más rápida que la utilizada por el Consorcio Público. De esta forma, Celera inició la secuenciación del genoma humano en septiembre de 1999. Mediante la técnica de *shotgun* se cortó el genoma en 70 millones de fragmentos, que se clonaron y secuenciaron. Se consiguió un primer ensamblaje de la secuencia orientada y ordenada del genoma utilizando 600 ordenadores en un tiempo record (25 de junio de 2000) y un segundo ensamblaje más perfeccionado el 1 de octubre de ese mismo año, que fue publicada el día 16 de febrero del 2001<sup>1</sup>.

El Proyecto del Consorcio Público, dirigido por Francis Collins, utilizó una estrategia denominada "basada en el mapa" o también secuenciación jerárquica a escopetazos que consiste en: a) fragmentar el ADN del genoma en trozos grandes, de tamaño comprendido entre 100-200 Kb y clonarlos en cromosomas artificiales de BAC, cada uno de los fragmentos fueron caracterizados parcialmente y ensamblados; b) secuenciación de estos fragmentos de estos clones por la técnica de *shotgun*, fragmentándolos en trozos pequeños, clonados en plásmidos, secuenciados y ensamblados (fig. 1). De esta forma, las zonas repetidas y los reordenamientos son más fáciles de localizar y se producen menos ambigüedades<sup>2</sup>.

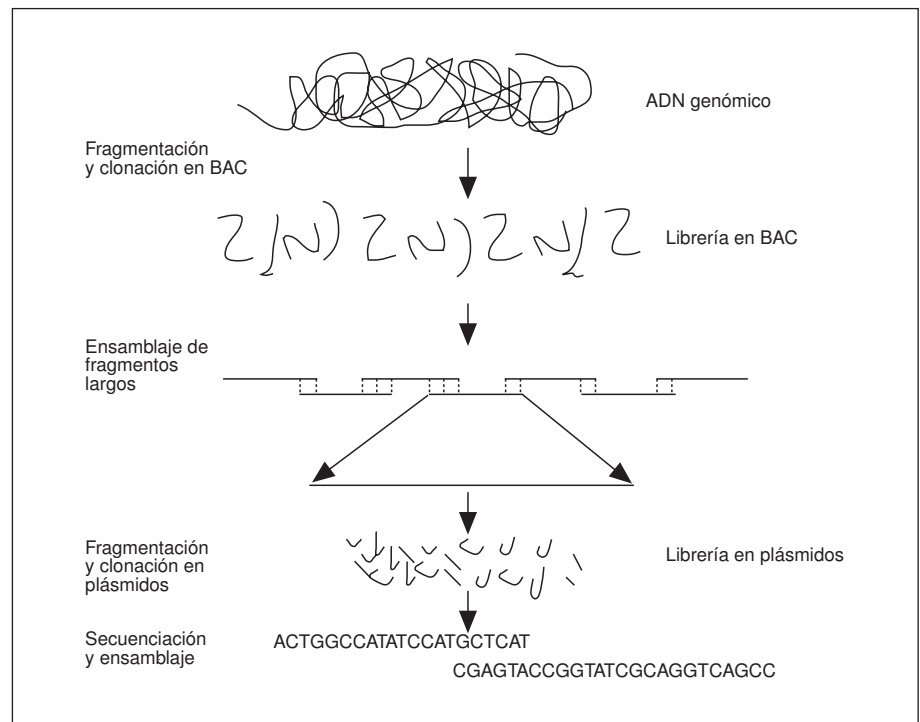
El proyecto de Celera requiere mayor trabajo de ensamblaje y resolver los solapamientos erróneos que el proyecto del Consorcio Público; sin embargo, este último tiene que dedicar mayor esfuerzo en el mapeado de fragmentos grandes. Los dos proyectos, el público y el privado, después de varios enfrentamientos pactaron un acuerdo, sin vencedores ni vencidos, y publicaron los datos alcanzados por cada grupo, presentando el borrador de la secuencia del genoma el 26 de junio de 2000 de forma conjunta. La publicación de los datos ha tenido lugar, recientemente, el 15 y el 16 de febrero en las revistas científicas *Nature* (Consorcio Público) y *Science* (Proyecto Celera)<sup>1,2</sup>.

### Otros proyectos

La empresa Human Genomic Sciences emprendió en 1992 un proyecto centrado en la secuenciación de genes, prescindiendo de las regiones no codificantes del genoma, habiendo conseguido en la actualidad la secuenciación de más del 95% de los genes que se expresan. La técnica utilizada consiste en realizar la transcripción inversa de los mRNA que se expresan, transformarlos a cADN, clonarlos



Figura 1. Esquema de cómo se realiza la secuenciación jerárquica shotgun.



y secuenciarlos. Su objetivo es fabricar medicamentos a partir del conocimiento de estos genes y no publican sus resultados en vistas a la elaboración de patentes.

### Características más destacables del genoma humano

1. El genoma humano es 25 veces más grande que el de los cualquiera de los anteriormente secuenciado.
2. Presenta una gran variación de la secuencia: zonas repetidas, elementos transponibles, zona ricas en GC.
3. Sólo tiene el doble de genes que la mosca de la fruta; sin embargo, son más complejos, con más sitios alternativos de ajuste (*splicing*) que generan un gran número de proteínas.
4. El conjunto de proteínas del genoma humano es más complejo que el de los invertebrados.
5. Sólo el 1,1% del genoma está ocupado por exones, el 24% por zonas intrónicas y el 75% por regiones intergénicas.
6. La mitad de los genes deriva de elementos transponibles.
7. La duplicación de segmentos de las regiones pericentroméricas y subteloméricas es más frecuente en humanos que en la levadura y mosca entre otros.
8. La tasa de mutaciones durante la meiosis en varones es mucho más alta que en mujeres. La mayoría de mutaciones tiene lugar en los varones.

9. Existe aproximadamente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) cada 1.300 pb. Por tanto, existen cerca de 2 millones de SNP a lo largo de todo el genoma. Esta colección de marcadores permite el estudio de mapas de desequilibrio. Sólo el 1% de los SNP están situados en zonas que se corresponden a exones con lo que, teóricamente, hay cerca de 20.000 que podrían afectar a la función de las proteínas.

10. El número de genes no se conoce todavía con precisión, pero se calcula que está en torno a los 30.000.

### Futuro: el inicio de otro largo camino

La secuencia del genoma humano supone el inicio de una nueva etapa, el inicio de un camino más que el final, una nueva era científica, médica, económica, social e incluso política. Se conocen las características parciales de algunos genes, aproximadamente 15.000. Hay unas 17.000 regiones que han sido identificadas por analogías con otras secuencias que se expresan, pero se desconoce si se transcriben, el tipo de proteína que producen y que función desempeñan. Desconocemos la función de la gran mayoría de genes, cómo se regulan y qué estructura tienen. También desconocemos qué genes están implicados en un gran número de enfermedades de origen genético.

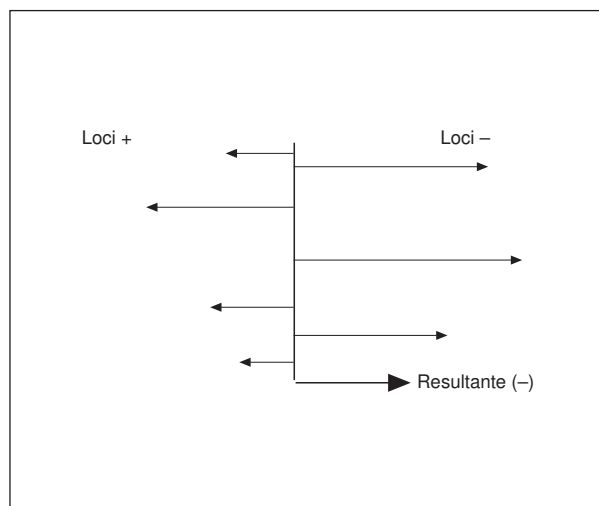


Figura 2. Los factores genéticos que determinan el riesgo cardiovascular son el resultado de efectos (inductores) positivos y (protectores) negativos.

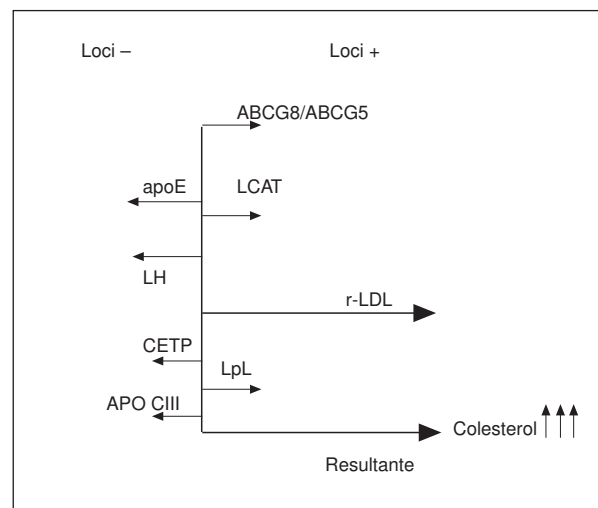


Figura 3. Algunos loci implicados en variabilidad del colesterol plasmático.

El proyecto genoma ha acelerado el futuro de la medicina preventiva, la farmacogenética, la terapia génica y el diseño de nuevos fármacos. Desde hace años, somos capaces de identificar diferencias genéticas entre los individuos, las cuales nos pueden predecir la respuesta de cada paciente a un determinado fármaco. Los individuos son el producto de la interacción de sus genes con el medio ambiente. La farmacogenética estudia cómo las diferencias genéticas influyen sobre la variabilidad en la respuesta de los medicamentos. El significado médico y el valor económico del conocimiento previo de una respuesta a un fármaco permite asegurar la eficacia y seguridad de un medicamento para un paciente determinado. La capacidad de poder tener, para un fármaco específico, tipificado a un paciente de forma rápida, también nos permitiría en un futuro elegir el tratamiento más adecuado para individuos con un fenotipo de enfermedad aparentemente idéntico. El proyecto Genoma Humano está proporcionando nuevas herramientas para encontrar componentes poligénicos implicados en la salud y enfermedad. Un listado de todos los conocidos hasta la fecha puede encontrarse en Internet ([www.sciencemag.org/feature/data/1044449.shl](http://www.sciencemag.org/feature/data/1044449.shl)).

### El conocimiento del genoma y las enfermedades cardiovasculares

En el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares intervienen múltiples factores genéticos y ambientales y el fenotipo que se observa en cada

individuo es el resultado de la interacción entre genes y ambiente. Desgraciadamente, en la actualidad no conocemos la totalidad de los factores ambientales y, a pesar de que está secuenciada casi la totalidad del genoma humano, desconocemos la gran mayoría de genes que intervienen en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

En determinados casos se conocen las causas genéticas específicas que son las responsables de algunos de los factores de riesgo más importante de las enfermedades cardiovasculares, como es el caso de mutaciones en gen del receptor LDL (r-LDL) en hipercolesterolemia familiar<sup>15</sup>. Como ejemplo basta mencionar que la clonación y la secuenciación de este gen, el gen del r-LDL, conseguido por el grupo de Joseph L. Goldstein y Michael Brown en el año 1984, ha supuesto uno de los avances más espectaculares en la medicina cardiovascular<sup>16</sup>. Por una parte, el conocimiento del gen del r-LDL y las alteraciones funcionales del mismo asociadas en sujetos con hipercolesterolemia familiar, han favorecido el entendimiento del metabolismo celular del colesterol y de las enzimas involucradas en el mismo. Por otra parte, el desarrollo de las estatinas, inhibidores de la HMG CoA reductasa, uno de los fármacos de mayor impacto clínico en la medicina cardiovascular, se debe en gran medida a los avances que se siguieron tras el conocimiento de la secuencia del gen del r-LDL y a los estudios basados en la hipercolesterolemia familiar.

En el caso de la hiperlipemia familiar combinada se sabe con toda certeza que se trata de una hi-

perlipemia de origen genético, pero se desconoce en la actualidad el gen o genes implicados en la misma. La secuencia del genoma permitirá avanzar de una forma más rápida en la identificación del defecto genético y en el desarrollo de dianas terapéuticas más eficaces que las existentes.

En las dislipemias multigénicas, como es el caso de la hipercolesterolemia poligénica, la predisposición a enfermar es el resultado del efecto acumulativo de variantes alélicas comunes, variantes que observadas individualmente sólo confieren un aumento moderado del riesgo. El reto futuro es identificar, por una parte, los patrones comunes multilocus que impliquen un riesgo elevado a padecer enfermedades cardiovasculares y, por otra, conocer los factores ambientales que modulan la expresión de predisposición a la enfermedad.

El número de variantes genéticas implicadas en las enfermedades cardiovasculares está aumentando de forma espectacular. A medida que se identifican nuevos genes candidatos se hace más necesario analizar múltiples loci de forma simultánea (fig. 2). Los estudios enfocados a analizar un solo marcador genético permiten asignar un riesgo relativo, pero esta aproximación sólo proporciona una visión parcial del riesgo global del paciente. En cambio, los resultados multilocus son clínicamente más informativos que los de un solo locus; así, por ejemplo, si se desea analizar desde el punto de vista genético la causa por la que un determinado individuo tiene elevado el colesterol es necesario analizar varios loci y trazar la resultante global de todos ellos (fig. 3).

En el futuro, cuando se identifiquen estos genes involucrados en el riesgo de la enfermedad cardiovascular, los marcadores de los mismos podrán ser utilizados como un complemento a los análisis bioquímicos clásicos (colesterol total, cLDL, cHDL, etc.) que ayudarán al clínico en el manejo de los

pacientes, pero con toda probabilidad, no sustituirán en ningún caso a los marcadores "clásicos", ni tampoco la exploración clínica del paciente.

## Bibliografía

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1350.
2. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-917.
3. Brink RE. *De Heritage from Mendel*. Madison: University of Wisconsin Press, 1967.
4. Garrod AE. *Inborn errors of metabolism*. Londres: Hodder and Stoughton, 1909.
5. Griffith F. Significance of pneumococcal types. *J Hygiene* 1928; 27: 113-159.
6. Avery O, MacLeod C, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation in *Pneumococcal* types. *J Exp Med* 1944; 79: 137-158.
7. Hershey A, Chase M. Independent functions of viral proteins and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952; 36: 39-56.
8. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.
9. Ochoa S. Chemical basis of heredity, the genetic code. *Experientia* 1954; 20: 57-68.
10. Nirenberg MW, Leder P. RNA code-words and protein synthesis. The effect of trinucleotides upon the binding of tRNA to ribosomes. *Science* 1964; 145: 1399-1407.
11. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 1961; 3: 318-356.
12. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 560-564.
13. Sanger F, Air GH, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA et al. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$  X174 DNA. *Nature* 1977; 265: 687-695.
14. Putney SD, Herliby WC y Schimmel PA. A new tropoin T and cDNA clones for 13 different muscle proteins, found by shotgun sequencing. *Nature* 1983; 302: 718-721.
15. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. (7. ed.). Nueva York: McGraw-Hill, 1995; 1981-2030.
16. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL et al. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 1984; 39: 27-38.