

Toxigenómica na Avaliação de Compostos Químicos

Toxigenomics in Toxicity Evaluation of Chemical Compounds

Lesseps dos Reis^{1,2}

¹ Professor Catedrático (ap) da Faculdade de Medicina de Lisboa, Av. Professor Egas Moniz
1649-028 Lisboa, Portugal

² Departamento Ciências da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376,
1749-026 Lisboa, Portugal

Resumo

Apesar do facto de vivermos mergulhados num ambiente cheio dos mais diversos produtos químicos pouca informação existe sobre a sua toxicidade em relação aos seres humanos e outros seres vivos. Por tal motivo as autoridades reguladoras vêm expressando a sua preocupação e planeiam aprovar novos regulamentos para a avaliação da toxicidade de vários milhares de produtos químicos de uso comum. Neste contexto tal envolverá estudos em larga escala de avaliação da toxicidade desses produtos. Com a informação reunida em bases de dados específicas e públicas espera-se obter uma melhor compreensão da sua importância para a saúde humana e para o ambiente. Tal facto ajudará a tomada de medidas preventivas na defesa da saúde humana e ambiental. Contudo os métodos convencionais de avaliação da toxicidade têm várias limitações que impedem ou dificultam a efectivação de estudos em larga escala como pretendido. Neste contexto a toxigenómica é uma ciência nova que pode contribuir para obviar as limitações dos métodos convencionais e nessa medida dar uma importante contribuição para o melhor conhecimento da segurança dos produtos químicos.

Palavras-Chave: toxicologia, toxigenómica, avaliação de toxicidade

Abstract

Notwithstanding the fact that we live immersed in an environment filled with a great variety of chemicals, the information about their safety to human beings and other living organisms is scarce. Therefore, the regulatory bodies have lately expressed their concern and are planning new regulations for the toxicity evaluation of several thousands of commonly used chemicals. Accordingly, this will involve the review of the safety of chemicals in large-scale studies with the application of conventional toxicity test protocols. With this information gathered in specific and public databases, it is hoped that we obtain a better understanding of their relevance for human health as well as for a sustainable environmental development. This will help in establishing preventive policies in defence of human health and the environment. However, the conventional methods of toxicity evaluation have several drawbacks to allow for the intended large-scale studies. In this context, toxigenomics is emerging as a science that might help to circumvent the limitations of conventional methods and therefore give a useful contribution to a better understanding of the mechanisms of action of chemicals at a biomolecular level and in this way enable toxicologists to foster the predictive aspects of toxicology.

Key-Words: toxicology, toxigenomics, toxicity evaluation

Recebido em 03/04/2006

Aceite em 06/05/2006

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2006; (3) I: 37-52

Versão electrónica: <http://revistasaudc.ulusofona.pt>

Introdução

A toxicologia é o estudo dos mecanismos de toxicidade e a sua subsequente aplicação na previsão dos efeitos adversos resultantes da exposição dum organismo a agentes químicos, físicos ou biológicos. É óbvio que os aspectos preditivos dependem dos mecanísticos, *i.e.* da investigação dos mecanismos envolvidos na interacção entre tóxicos e organismos.

Os compostos químicos constituem um grupo importante no universo de compostos potencialmente nocivos para os seres vivos. De facto, existem milhares de substâncias químicas no meio ambiente. Muitas delas são de origem natural, enquanto outras são intencionalmente produzidas para os mais variados fins e outras ainda são consequência da poluição causada pelas actividades industriais.

Paradoxalmente, com excepção dos compostos químicos produzidos para fins terapêuticos (fármacos), cosméticos, aditivos alimentares e pesticidas, que são obrigatoriamente sujeitos a prévia avaliação de toxicidade antes da sua introdução no mercado, existe uma falta de informação sobre a toxicidade potencial da grande maioria de substâncias químicas existentes no ambiente.

Segundo os inquéritos efectuados pelo US Environmental Defense Fund em 1997, não se encontra publicamente disponível, mesmo os resultados dos testes de toxicidade mais básicos para quase 75% dos compostos químicos de maior volume já no mercado^[1]. Em consequência deste facto, a EPA (Environmental Protection Agency), juntamente com o American Chemistry Group, tomaram a iniciativa de recomendar um programa de avaliação da toxicidade de cerca de 2.800 produtos químicos fabricados ou importados em quantidades superiores a 450 toneladas por ano.

Idêntica preocupação existe na União Europeia. Com o objectivo de proteger a saúde humana e o ambiente, em Outubro de 2003, o Conselho de Europa, sob proposta da Comissão Europeia, aprovou um programa de criação dum enquadramento legal para regular o registo, avaliação e autorização de produtos químicos. Este programa passou a ser conhecido como REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)^[2].

Após vários anos de encontros entre peritos de representantes das indústrias químicas, a Comissão submeteu ao Conselho da Europa um projecto cuja primeira avaliação foi aceite pelo Parlamento Europeu em Novembro de 2005. Espera-se que o Parlamento e o Conselho da Europa dêem a aprovação final no Outono de 2006. O programa REACH tornar-se-á efectivo na Primavera de 2007 e totalmente operacional em 2008.

Prevê-se que os estudos envolvidos neste programa sejam efectuados por fases e se prolonguem por onze anos após tornar-se obrigatório com a nova legislação.

Introduction

Toxicology is the study of the mechanisms of toxicity and its subsequent application in prediction of the adverse effects resulting from an organism's exposure to chemical, physical or biological agents. It is obvious that the predictive aspects depend on the mechanistic ones, *i.e.* on the research of mechanisms involved in the interaction between toxicants and organisms.

Chemicals are a very important group in the universe of potentially hazardous compounds for living organisms. In fact, there are thousands of chemical substances in the environment. Many of these are of natural origin, while man for the most varied ends intentionally produces others, and others still are a consequence of the pollution caused by industrial activities.

Paradoxically, with the exception of chemicals produced for therapeutic usage (pharmaceuticals), cosmetics, food additives and pesticides which must be subject to a toxicity evaluation prior to its introduction into the market a lack of information prevails on the potential toxicity of the great majority of chemicals present in the environment.

According to studies carried out by the US Environmental Defense Fund in 1997, no information was available in public record, even the most basic toxicity testing results for nearly 75% of the top-volume chemicals in commercial use^[1]. As a result, the EPA (Environmental Protection Agency) along with the American Chemistry Group, have taken the initiative of advising a toxicity evaluation program of about 2,800 chemical products manufactured or imported in quantities greater than 450 tons per year.

An identical concern subsists in the European Union. With the objective of protecting human health and the environment, in October of 2003, the European Council, under the proposal of the European Commission, approved a program for creation of a legal framework for the regulation of the registry, evaluation and authorization of chemical products. The program came to be known as REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals)^[2].

After several years of meetings of experts with chemical industry representatives, the Commission submitted to the European Council a project whose first assessment was accepted by the European Parliament in November of 2005. The Parliament and the Council of Europe expect the final approval in autumn of 2006. The REACH program should thus become effective in the spring of 2007 and be fully operational as of 2008.

It is anticipated that the studies involved in this program will be phased and extended for eleven years after becoming in force with the new legislation. Priority will be given to chemicals manufactured and

Será dada prioridade aos produtos químicos fabricados e comercializados em grandes quantidades (superiores a 1 tonelada/ano/companhia).

Com grande colaboração da indústria, em 1990 a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) deu um grande passo ao criar um programa internacional com o objectivo de obter a informação básica sobre a toxicidade de compostos químicos de elevado volume (mais de 1000 toneladas). O programa Screening Information Data Set (SIDS) dá ênfase ao conceito de rastreio dos compostos químicos com base no conjunto preliminar de informação básica relacionada com eles. Entre outras informações consta o seu destino e vias no meio ambiente, bem como informação sobre a respectiva ecotoxicologia e toxicologia. Por exemplo, a informação toxicológica básica requerida está indicada no Quadro 1.

Quadro 1 - Informação toxicológica do SIDS
Table 1 - OECD Screening Information (SIDS)

5. Informação toxicológica
<i>Toxicological Information</i>
5.1. Toxicidade aguda
<i>Acute toxicity</i>
5.2. Toxicidade após doses repetidas
<i>Repeated dose toxicity</i>
5.3. Genotoxicidade (<i>in vitro</i>)
<i>Genetic toxicity (in vitro)</i>
5.4. Genotoxicidade (<i>in vivo</i>)
<i>Genetic toxicity (in vivo)</i>
5.5. Toxicidade reprodutiva
<i>Reproductive toxicity</i>
5.6. Teratogenicidade
<i>Teratogenicity</i>

Os compostos considerados como sendo potencialmente carcinogénicos bem como aqueles que tenham elevados índices de persistência no meio ambiente (Persistent Organic Pollutants ou POPs) serão registados e deverão ter uma autorização especial. Ao mesmo tempo, será concedida atenção especial aos tóxicos que sejam persistentes e bioacumulativos (Persistent and Bioaccumulative ou PBTs) ou muito persistentes e muito biocumulativos (Very Persistent and Vert Bioaccumulative ou VPVBs).

O programa REACH muda a legislação vigente na UE até 1981. É estabelecida uma distinção entre os produtos químicos *existentes* (introduzidos no mercado antes de 1981) e calculados em quase

commercialized in large quantities (more than 1 ton/year/company).

With extensive participation of the industry, in 1990 the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) took a major step by creating an international program to obtain toxicity basic information on high-volume chemicals (> 1000 tons). The Screening Information Data Set (SIDS) program emphasizes the concept of screening chemicals on the basis of a minimum of preliminary set of basic data about them. Amongst other information data set elements it comprises environmental fate and pathways, ecotoxicological and toxicological data. For example, the minimum toxicological data required is indicated in Table 1.

The compounds considered as being potentially carcinogenic as well as those with high indexes of persistence in the environment (Persistent Organic Pollutants or POPs) will be registered and have a special authorization. At the same time, specific attention will be given to the toxicants that are Persistent and Bioaccumulative (PBTs) or Very Persistent and Very Bioaccumulative (VPVBs).

The REACH program changes the legislation in effect until 1981 in the EU. A distinction is established between *existing* chemical products (introduced in the market before 1981) and evaluated as close to 100,000 from the *new* chemicals. The latter ones, introduced after 1981 (close to 4,300) should be tested in terms of their toxicity. However, it is probable that more of the

100.000 dos produtos químicos *novos*. Estes últimos, introduzidos após 1981 e estimados em quase 4.300 devem ser testados em termos da sua toxicidade. Contudo, é provável que mais 30.000 dos compostos já existentes sem informação básica careçam de avaliação de toxicidade.

Nos termos do programa REACH, os fabricantes, importadores e utilizadores destas substâncias químicas devem facultar a informação às entidades públicas e adoptar as medidas necessárias para a avaliação e gestão do risco. Risco entendido não só em termos de saúde humana e ocupacional, com também em relação aos impactes ambientais dos produtos químicos.

A implementação do programa REACH constitui um grande desafio para os toxicologistas. Eles devem facultar à indústria química os meios técnicos para cumprir as novas directivas. Para melhor se avaliar a dimensão deste desafio é conveniente rever a metodologia convencional corrente para avaliação da toxicidade dos compostos químicos.

Metodologia convencional para avaliação da toxicidade dos compostos químicos

No presente o estado da arte no que diz respeito a avaliação da toxicidade de compostos químicos compreende os ensaios de toxicidades aguda, subaguda e crónica.

Nos ensaios de **toxicidade aguda** os efeitos adversos são observados num curto intervalo de tempo após exposição ao composto químico. Esta exposição pode ser a administração duma dose única, ou uma breve exposição contínua, ou ainda doses múltiplas num intervalo de 24 horas ou menos.

Nos ensaios de **toxicidade subaguda** os efeitos adversos são observados após repetidas exposições diárias ao composto químico, ou exposição durante uma parte significativa da vida do organismo (habitualmente não superior a 10%). Com animais de experimentação, o período de exposição pode ir de poucos dias a meses.

Nos ensaios de **toxicidade crónica** os efeitos adversos são observados após repetidas exposições durante uma apreciável parte da vida do organismo (habitualmente mais de 50%). Para os seres humanos a exposição crónica significa várias décadas; nos animais é usual ser superior a 3 meses. A exposição crónica aos compostos químicos em ratos ou ratinhos pode ser utilizada para avaliar o potencial carcinogénico dos produtos. Em termos de toxicidade crónica, para além do potencial carcinogénico são também de interesse os potenciais efeitos teratogénico, mutagénico e na capacidade reprodutiva.

A maior parte dos ensaios de avaliação das toxicidades subaguda e crónica são efectuados mediante a monitorização dos efeitos observados nas células, tecidos, órgãos ou no organismo inteiro (Quadro 2).

30,000 of the already existing compounds without basic information will require further toxicity evaluation.

In terms of the REACH program, the manufacturers, importers and users of these chemical substances shall provide pertinent information for public authorities and adopt the necessary measures for the evaluation and management of the risk. The risk is understood not only in terms of human and occupational health, but it also regards the environmental impacts of the chemical products.

Implementing the REACH program represents a great challenge for toxicologists. They have to provide the chemical industry with the technical methods to comply with the new directives. To better evaluate the dimension of this challenge, it is convenient to review the conventional methodology currently in use for the toxicity evaluation of chemical compounds.

Conventional methodology for toxicity evaluation of chemical compounds

The current state of the art regarding toxicity evaluation of chemical compounds comprises assays for acute, subacute and chronic toxicities.

In the **acute toxicity** assays adverse effects are observed within a short time of exposure to the chemical. This exposure may be a single dose, or a short continuous exposure, or multiple doses administered over 24 hours or less.

In the **subacute (subchronic) toxicity** assays adverse effects are observed following repeated daily exposure to a chemical, or exposure for a significant part of an organism's lifespan (usually not exceeding 10%). With experimental animals, the period of exposure may range from a few days to 6 months.

In the **chronic toxicity** assays adverse effects are observed following repeated exposure during a substantial fraction of an organism's lifespan (usually more than 50%). For humans, chronic exposure means several decades; for experimental animals, it is typically more than 3 months. Chronic exposure to chemicals over periods of 2 years using rats or mice may be used to assess the carcinogenic potential of chemicals. In terms of chronic toxicity besides the carcinogenic potential, teratogenic and mutagenic effects, the eventual adverse effects on the reproductive capacity of living organisms have also to be considered.

Most of the subacute and chronic toxicities evaluation assays are carried out through monitorization of the effects observed on cells, tissues, organs or the entire organism (Table 2).

Quadro 2 - Métodos actuais na avaliação da toxicidade (listagem não exaustiva)
Table 2 - Current toxicity evaluation tests (non-exhaustive list)

- Marcadores de função ou de homeostase
Markers of function or homeostasis
 Ureia, electrólitos, tipos de células, pressão arterial, ECG, etc.
Urea, electrolytes, types of cells, arterial pressure, ECG, etc.
- Marcadores da integridade das células e tecidos
Markers of integrity of cells and tissues
 Transaminases, fosfatase alcalina, creatina-fosfoquinase, troponina, etc.
Transaminases, alkaline phosphatase, phosphocreatine, troponin, etc.
- Marcadores de lesões ou reacções a lesões de órgãos e tecidos
Markers of lesions or reactions in organs or tissues
 Avaliação do crescimento de órgãos e tecidos (pesos)
Evaluation of the growth of organs and tissues (weights)
 Exames anátomo-patológicos macro e microscópicos
Histopathology exams
 Reacções de defesa do organismo (infiltração dos tecidos, reacções imunológicas)
Reactions of the organisms' defences (infiltration in a tissue, immunological reactions)
- Outros efeitos
Other effects
 Reprodução
Reproduction
 Mutagénese
Mutagenesis
 Carcinogénese
Carcinogenesis
 Outras funções específicas
Other specific functions
 EEG, CV
EEG, CV
 Efeitos neurológicos e comportamentais
Neurological and behavioural effects
 Imunotoxicologia
Immunological
 Pulmonares
Pulmonary
 Dérmicas
Dermic
 Oculares
Ocular
 etc.

A lista dos ensaios de toxicidade indicada no Quadro 2 requer, para a sua execução, de grandes investimentos não só de ordem económica, como também de elevado número de animais, já para não mencionar o lapso de tempo necessário. Para cada composto em estudo estima-se que os custos podem atingir o equivalente a 2 milhões de euros e a utilização de cerca de 4.000 animais.

Se bem que a experimentação animal seja correntemente utilizada nos métodos de avaliação da toxicidade, ela padece de várias limitações. Em primeiro lugar, os elevados custos e o tempo necessário fazem com que a experimentação animal em grande escala seja difícil ou mesmo impraticável. Por exemplo, os estudos do potencial carcinogénico dum único composto em ensaios com roedores possa prolongar-se aproximadamente por três anos e atingir custos da ordem dos milhões de euros. Neste contexto, é de esperar alguma relutância da parte da indústria. Assim, na indústria farmacêutica, os ensaios de toxicidade de novas moléculas implicam um considerável atraso na recuperação dos investimentos envolvidos na investigação e desenvolvimento (I&D). Por outro lado, se os protocolos correntes forem cumpridos com o estudo da toxicidade dos compostos químicos de acordo com o programa REACH a estimativa de custos atingiria o total de 11,5 biliões de euros. Além disso, o programa REACH implicaria o sacrifício de 13 milhões de euros. Outro factor limitante é a escassez de laboratórios certificados com GLP (Good Laboratory Practices) para estudos de toxicidade na UE.

Em segundo lugar, a extrapolação de estudos em animais para os seres humanos nem sempre é fiável. Os estudos de farmacogenética experimental desde há muito revelaram a existência de diferenças importantes entre animais e seres humanos e mesmo entre diferentes raças da mesma espécie em termos de respostas farmacológicas^[3]. Por consequência os resultados experimentais, particularmente os obtidos mediante a administração de elevadas doses de compostos químicos, não permitem uma extrapolação fidedigna para os seres humanos. Tal circunstância justifica um certo grau de incerteza nos aspectos preditivos dos resultados da experimentação animal. E por consequência reforça a necessidade de métodos e técnicas alternativos de índole mecanicista que sejam mais económicos, mais rápidos e que permitam poupar o sacrifício de milhares de animais. Ou seja métodos com maior valor preditivo do que os baseados na experimentação animal^[4]. Idênticas reservas são igualmente válidas em relação aos ensaios de teratogenicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva.

Finalmente, os constrangimentos impostos pela sociedade (nomeadamente pelos movimentos activistas que defendem os direitos dos animais e o seu

The list of toxicity tests shown in Table 2 requires great investments not only at an economic level, but also in terms of the sacrifice of a high number of animals, not to mention on the amount of time needed to carry out their execution. For each compound studied, it is estimated that the costs may reach the equivalent of 2 million euros and the use of about 4,000 animals.

Although common in toxicity evaluation methods, animal experimentation has several shortcomings. First of all, the economic costs and the time required make resorting animal experimentation in large-scale difficult or even unfeasible. For example, the studies of carcinogenic potential of one single chemical compound in rodent bioassay can take up to, approximately three years and the costs may reach millions of euros. In this context, some resistance is to be expected from the industry. Thus, in the pharmaceutical industry, toxicity tests on new molecules imply a considerable delay on the recovery of investments involved in research and development (R&D). On the other hand, if the current protocols were to be complied with in the study of toxicity in chemical compounds according the REACH program the costs estimated would reach the sum of 11,5 billion euros. Furthermore, the REACH program would imply the sacrifice of about 13 million animals. Another limiting factor is the insufficient number of laboratories with the GLP (Good Laboratory Practices) certification for toxicological tests in the EU.

Secondly, the extrapolation from animal studies to human beings is not always reliable. The studies of experimental pharmacogenetics had unveiled important genetic differences between animals and humans and even between different breeds of the same species regarding the pharmacological responses^[3]. Hence the experimental results, particularly those obtained through the administration of high doses of chemicals, didn't allow for a reliable extrapolation for human beings. This justifies a certain degree of uncertainty in the predictive aspects of animal experimentation data. And thus reinforces the need for alternative methods or techniques of a mechanistic nature that may be more economic, faster and sparing of the sacrifice of thousands of animals. Hence methods with greater predictive value than those obtained by animal experimentation data^[4]. Similar reservations are also valid with regard to teratogenicity, carcinogenicity and reproductive toxicities tests.

Finally, as the constraints imposed by society (namely activist movements that defend animal rights and welfare), as well as the legal and ethical requirements related to animal experimentation have been growing imposing added pressure on researchers

bem-estar), bem como os requisitos legais e éticos relacionados com a experimentação animal têm crescido, impondo maior pressão sobre os investigadores no sentido de serem encontrados métodos alternativos.

Em 1959 Russel e Burch desenvolveram o conceito de protecção e bem-estar animal baseado na regra dos 3 Rs (**Reduction, Refinement e Replacement**)^[5]. Este conceito tornou-se útil na elaboração de orientações para reduzir o número de animais utilizados, poupando tanto quanto possível o seu sofrimento e morte.

Desde então têm sido tomadas algumas medidas. Por exemplo a substituição dos animais por outros sistemas biológicos (culturas de células e tecidos, células estaminais, bactérias, invertebrados, etc.)^[6]. Ou o aperfeiçoamento de métodos estatísticos que permitem a redução do número de animais utilizados na avaliação da toxicidade aguda. Nestes ensaios, dos quais a determinação da DL_{50} é o mais conhecido, sacrificam-se ao nível internacional quase um terço dos animais utilizados em experimentação. Mas este número baixou de 150 animais por composto químico em 1970 para 8 animais em 2002 com o recurso à aplicação de tratamentos estatísticos especiais^[7,8,9]. As organizações internacionais tais como a OCDE já recomendaram a substituição da DL_{50} por métodos alternativos que utilizam menor número de animais e que, quando possível, evitem a sua morte.

Novas perspectivas na avaliação da toxicidade de compostos químicos

Em 1991, foi criado o ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)^[10] com o objectivo de se encontrar métodos alternativos para avaliação da toxicidade que tornem exequível o estudo de cerca de 30.000 compostos químicos nos termos da entrada em vigor do programa REACH num próximo futuro na UE. Este centro actua como órgão de apoio à Comissão Europeia e deve coordenar ao nível europeu a avaliação independente do interesse e fiabilidade dos ensaios para fins específicos, de modo que os compostos químicos e outros produtos de variada natureza, incluindo medicamentos, cosméticos, produtos de uso doméstico e agrícola, possam ser fabricados, transportados e utilizados de forma mais económica e mais segura, ao mesmo tempo que a presente dependência de ensaios em animais seja gradualmente diminuída.

Entre 2000 e 2005 o ECVAM validou aproximadamente 20 ensaios e elaborou recomendações para a retirada de alguns. Por exemplo propôs a eliminação do ensaio de toxicidade aguda oral DL_{50} de acordo com as recomendações da OCDE.

Entre os ensaios alternativos de avaliação da

to find alternative methods.

In 1959 Russel and Burch developed the concept of animal protection and welfare based on the rule of the 3 Rs (**Reduction, Refinement and Replacement**)^[5]. This concept became useful in developing guidelines for reducing the number of animals used, sparing as much as possible their suffering or death.

Since then some steps have been taken. For instance the replacement of animals by other biological systems (cell and tissue cultures, staminal cells, bacteria, invertebrates, etc.)^[6]. Or the improvement of statistical methods that allowed for the reduction of the number of animals used in acute toxicity evaluation. These tests, of which the determination LD_{50} is the most well known, sacrifice at international level almost one third of the animals used in experiments. But this number decreased from 150 animals per chemical compound in 1970 to 8 animals in 2002 with the application of special statistical treatments^[7,8,9]. International organizations such as the OECD have already advised the substitution of the LD_{50} with alternative methods that use smaller number of animals and that when possible, prevent their death.

New perspectives in toxicity evaluation of chemical compounds

In 1991, the ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)^[10] was created with the objective of finding alternative methods for toxicity evaluation that make the study of about 30,000 chemical compounds feasible under the soon operational REACH program in the EU. This centre acts as a supportive organ to the European Commission and has to co-ordinate at the European level the independent evaluation of the relevance and reliability of tests for specific purposes, so that chemicals and products of various kinds, including medicines, cosmetics, household products and agricultural products, can be manufactured, transported and used more economically and more safely, while the current reliance on animal test procedures is progressively reduced(<http://ecvam.jrc.it/>).

From 2000 to 2005 the ECVAM has validated approximately 20 tests and make recommendations for some deletions. For example it has proposed the deletion of the acute oral toxicity test (LD_{50}) following the guidelines of OECD.

Amongst the alternative tests of toxicity evaluation methods for chemicals some are the result of the new technologies arising within the domain of functional genomics.

toxicidade de compostos químicos alguns resultam das novas tecnologias emergentes no domínio da genómica funcional.

Genoma e avaliação da toxicidade : toxigenómica^[11]

Completada a sequenciação do genoma humano em 2001^[12,13,14], bem como de outros genomas, foi dado um grande impulso à genómica funcional. Contudo os aspectos estruturais continuam a ser investigados tal como se demonstra pela definição do mapa dos haplotipos^[15,16] e pela alocação dos genes aos cromossomas^[17].

As inovações tecnológicas têm contribuído para uma melhor compreensão do modo como o genoma interage com o meio ambiente.

Uma das primeiras conclusões da genómica funcional foi a de que o paradigma da genética mendeliana "um gene, uma proteína" já é válido. Assim, em termos de transcrição duma sequência de DNA codificada pode resultar mais dum ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) devido à variação do processo de corte/união que ocorre durante a maturação do mRNA transcrito do DNA. Também em termos de tradução proteínas de diferentes conformações podem corresponder a um determinado mRNA. Ou ainda que certas moléculas de mRNA não são traduzidas em proteínas mas exercem acções moduladoras noutros genes.

Foram definidas várias plataformas de investigação para melhor se compreender como funciona o genoma. Não somente em situações fisiológicas (*e.g.* na função do órgão, ou estágio de desenvolvimento) mas também em situações patológicas (doenças) ou em condições de exposição a diversos factores ambientais stressantes tais como os compostos químicos.

No presente trabalho justifica-se uma referência especial aos métodos alternativos de avaliação da toxicidade através a investigação das modificações de expressão génica sob influência de compostos químicos tais como fármacos, hormonas, disruptores endócrinos ou tóxicos ambientais.

Este novo campo de investigação é designado de Toxigenómica. Pode ser definido como o domínio científico de estudo do modo como tóxicos conhecidos ou suspeitos actuam ao nível genético.

Tal como se ilustra na Fig.1 os estudos de toxigenómica podem ser efectuados em diferentes níveis da expressão génica: ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), proteínas e metabólitos. A informação assim colectada deve ser integrada e interpretada com a obtida através da toxicologia convencional. Com o recurso à bioinformática, toda a informação procura um melhor entendimento do papel das interacções gene/ambiente no determinismo das doenças^[18].

Genome and toxicity evaluation: toxigenomics^[11]

With the complete sequencing of the human genome, established in 2001^[12,13,14] and other genomes as well a great impulse was given to functional genomics. However, structural aspects continue to be investigated as is shown by the definition of the haplotype map^[15,16] and by the allocation of the genes to the chromosomes^[17].

New technological innovations are helping to give a better insight on how the genome act and interact with the environment.

One of the earlier conclusions of the functional genomics was that the Mendelian genetics paradigm "one gene, one protein" was no longer sustainable. Thus, in terms of the transcription of a codified sequence of DNA, more than one messenger RNA (mRNA) may result due to the variation of splicing/union process that takes place during the maturity of the mRNA transcribed from the DNA. Also in terms of the translation, that several proteins of different conformations can correspond to one determined mRNA. Or even still that certain mRNA molecules are not translated into proteins but exert modulatory actions in other genes.

Several research platforms have been defined to help a better understanding of how the genome works. Not only in physiological situations (*e.g.* in the organ's function or the state of development) but also in pathological ones (diseases), or under conditions of exposure to diverse and stressing environmental factors such as chemical compounds.

In the present work, a special reference is due to alternative methods of toxicity evaluation through research on gene expression modifications under the influence of chemical compounds, be they drugs, hormones, endocrine disruptors, or environmental toxicants.

This new field of inquiry is known as Toxigenomics. It may be defined as a scientific domain of study of the way in which known and suspected toxicants act at the genetic level.

As shown in Fig.1 toxigenomic studies can be carried out at the different levels of gene expression: messenger ribonucleic acid (mRNA), proteins and metabolites. The information thus collected has to be integrated and interpreted with that of conventional toxicology. Altogether and with the aid of bioinformatics, seek to understand the role of the gene/environment interactions in disease^[18].

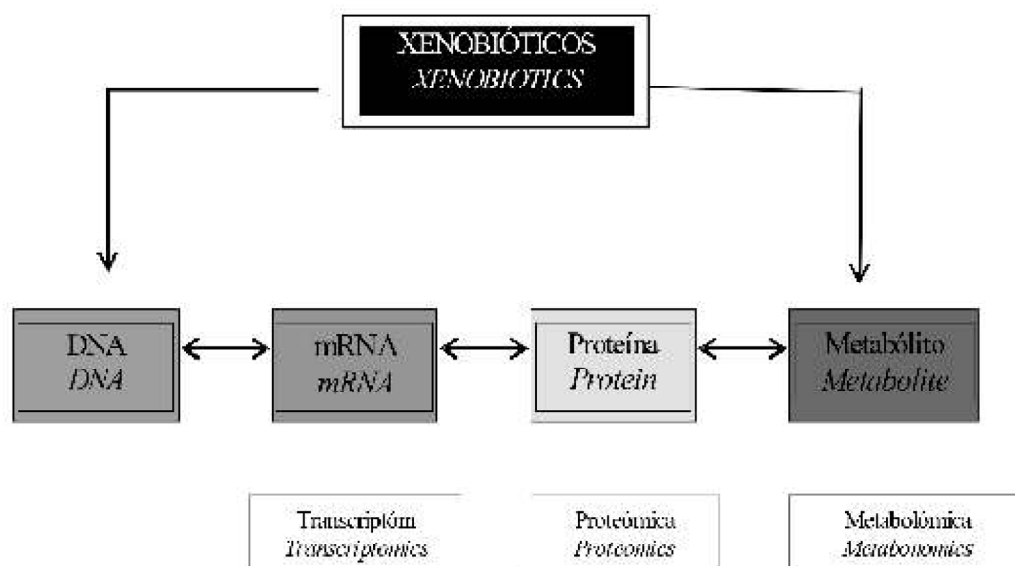


Figura 1 - Diferentes níveis ou plataformas da toxigenômica
Figure 1 - Different levels or platforms of toxicogenomics

As diferentes plataformas “-ômicas” são designadas de acordo com o material utilizado na investigação da variação da expressão gênica, desde o gene propriamente dito até às proteínas e metabólitos: transcriptômica, proteômica e metabonômica.

Transcriptômica^[19,20,21]

Em termos genéticos foram identificados cerca de 22.000 genes no genoma humano. As funções destes genes só é conhecida para uma pequena percentagem dos mesmos. Estas funções continuam a ser investigadas para a maior parte dos genes, o que implica a cooperação entre vários centros de pesquisa bem como a criação de uma ou mais bases centralizadas para o tratamento dessa informação^[17].

Considerando o transcriptoma como o conjunto de todas as moléculas de mRNA (*transcritos*) numa célula ou num conjunto de células biológicas, por transcriptômica entende-se a análise global da expressão gênica diferencial através do transcriptoma num dado conjunto de circunstâncias ambientais.

As moléculas de mRNA extraídas das células e tecidos são analisadas com técnicas de micromatrizes (*microarrays*) utilizando como sondas o DNA complementar (DNA_c) obtido do mRNA por transcriptase reversa ou matrizes de oligonucleótidos do próprio DNA. O aperfeiçoamento do fabrico destas micromatrizes já permite a produção de lâminas de 10

The different “-omic” platforms are coined according the material used for research in the differential genome expression, from the gene itself to the proteins and metabolites: transcriptomics, proteomics and metabonomics.

Transcriptomics^[19,20,21]

From the genetics point of view, close to 22,000 genes have been identified in the human genome. Only for a small percentage of these genes the full functions are known. There is ongoing research on the function of the majority of genes, which requires cooperation between several research centres as well as the establishment of one or more centralized databases for treatment of that information^[17].

Considering the transcriptome as the set of all mRNA molecules (or *transcripts*) in one or a population of biological cells, transcriptomics means the global analysis of differential gene level expression through the transcriptome for a given set of environmental circumstances.

The mRNAs extracted from the cells and tissues are studied with microarray techniques using as probes the complementary DNA (DNA_c) obtained from the mRNA by reverse transcriptase or oligonucleotide arrays of the DNA itself. Perfecting the manufacture of these microarrays allows for the production of thin plates that are 10 cm² long with 43,000 probes^[22]. In

cm² de comprimento com 43.000 sondas^[22]. Ou seja, mesmo admitindo mais do que um tipo de mRNA por gene, é possível proceder a uma análise diferencial do transcriptoma global nas células ou tecidos expostos a diferentes xenobióticos.

É importante mencionar que não obstante existir somente um genoma para todas as células do organismo podem ocorrer diferentes transcriptomas na mesma célula ou em células diferentes, de acordo com a fase do ciclo celular, com o órgão, estágio de desenvolvimento, etc.. Tal facto deve ser tido em conta quando se comparam as expressões transcriptômicas em sistemas biológicos expostos a compostos químicos.

Na aplicação da transcriptômica à toxicologia, os investigadores devem prestar particular atenção aos genes mais susceptíveis de reagir a factores ambientais. Estes genes tendem a agrupar-se em várias categorias tais como as que são controladores do ciclo celular, a divisão e estrutura das células, a reparação do DNA, a apoptose e o metabolismo.

Proteómica^[23,24,25]

A globalidade das proteínas existentes num organismo durante o seu ciclo de vida ou, em menor escala, a globalidade das proteínas encontradas num tipo particular de células sob um determinado tipo de estimulação, é designada, respectivamente, de proteoma do organismo ou do tipo de célula.

Por proteómica entende-se o estudo em grande escala das proteínas codificadas pelo genoma, em particular as suas estruturas e funções. Inclui não só a identificação e quantificação das proteínas, como também a sua localização, estrutura, modificações, interacções (interatômica) e, finalmente, as respectivas funções^[26]. Assumindo a ocorrência de até 40.000 proteínas no organismo, torna-se evidente o tremendo desafio posto aos cientistas que se dedicam à proteómica.

O perfil do proteoma varia de célula para célula e está constantemente a ser alterado através das interacções bioquímicas entre o genoma e o meio ambiente. Por consequência, um organismo terá uma expressão proteómica radicalmente diferente em diferentes partes do organismo, em diferentes estádios do seu ciclo de vida e em diferentes circunstâncias ambientais.

Para além dos métodos clássicos já estabelecidos para estudo das proteínas, existem também técnicas inovadoras a serem aplicadas neste campo^[27].

Metabolómica (ou Metabonómica)^[28,29]

O metaboloma representa o conjunto de todos os metabólitos num organismo biológico, que são os produtos finais da expressão génica. Por metabolómica entende-se o estudo sistemático dos marcadores químicos únicos deixados pelos processos

other words, even considering more than one type of mRNA per gene, it is possible to proceed with a differential analysis of the global transcriptome in cells or tissues exposed to diverse xenobiotics. Perfecting the manufacture of these microarrays allows for the production of thin plates that are 10 cm² long with 43,000 probes^[22]. In other words, even considering more than one type of mRNA per gene, it is possible to proceed using differential analysis of the global transcriptome in cells or tissues exposed to diverse xenobiotics.

It is important to mention that although there is only one genome for every cell of the organism there may occur different transcriptomes in the same or different cells, according the cell cycle phase, the organ, developmental stage, etc.. This has to be taken in account when comparing the differential transcriptome expressions in biologic systems exposed to chemicals.

In the application of transcriptomics to toxicology, the researchers have to give special attention to the genes more prone to react to environmental factors. These genes tend to group themselves into several categories such as those that control the cell cycle controllers, the division and cell structure, the DNA repair, the apoptosis and the metabolism.

Proteomics^[23,24,25]

The entirety of proteins in existence in an organism throughout its life cycle, or on a smaller scale the entirety of proteins found in a particular cell type under a particular type of stimulation, are referred to as the proteome of the organism or cell type respectively.

Proteomics is the large-scale study of proteins codified by the genome, particularly their structures and functions. It includes not only the identification and quantification of proteins, but also its localization, structure, modifications, interactions (interatomic) and, finally their respective functions^[26]. Assuming the occurrence of up to 400,000 proteins in the organism, it becomes evident the daunting challenge faced by scientists engaged in proteomics.

The proteome differs from cell to cell and is constantly changing through its biochemical interactions with the genome and the environment. So one organism will have radically different protein expression in different parts of its body, in different stages of its life cycle and in different environmental conditions.

Besides the classical methods already established for the study of proteins, there are also innovative techniques being applied in this field^[27].

Metabolomics (or Metabonomics)^[28,29]

The metabolome represents the collection of all metabolites in a biological organism, which are the end products of its gene expression. Metabolomics

celulares. Também se utiliza o termo metabonómica, particularmente no contexto da avaliação toxicológica de fármacos.

Várias dezenas de metabólitos têm sido utilizados, desde há décadas, como biomarcadores em medicina. Contudo como os quase 20.000 metabólitos que se presume existirem, é muito provável que outros venham a ser identificados como biomarcadores úteis, em especial os que contribuam para um melhor entendimento dos mecanismos de acção dos xenobióticos e vias metabólicas afectadas. Estes também servirão de biomarcadores úteis para o diagnóstico precoce de patologias consequentes da exposição a tóxicos ambientais e poderão ajudar na sua prevenção.

Em resumo, um composto químico pode actuar ao nível do genoma (DNA), dos processos de transcrição, da modulação das proteínas e da sua actividade enzimática. Por consequência os estudos de toxigenómica podem ocorrer em diferentes níveis desta sequência com o recurso às já mencionadas técnicas de transcriptómica, proteómica e metabolómica. Contudo, como se pode depreender do Quadro 3, estas diferentes tecnologias '-ómicas' têm vantagens e desvantagens.

means the systematic study of the unique chemical fingerprints that cellular processes leave behind. The word metabonomics is also used, particularly in the context of drug toxicity assessment.

Since decades some dozen of metabolites have been used as biomarkers in medicine. However, with the about 20,000 metabolites that may exist, it is quite probable that others might come to be identified as useful biomarkers, especially those that allow for a better understanding of the mechanisms of action of the xenobiotics and the affected metabolic paths. These will also serve as useful biomarkers for early diagnosis of pathologies caused by exposure to environmental toxicants and in that way help in its prevention.

Summing up a chemical agent may act at the level of the actual genome (DNA), of the transcription processes, of the modulation of proteins, and their enzymatic activity. Therefore toxigenomics studies may occur at various levels of this sequence through the resort of the above-mentioned techniques of transcriptomics, proteomics and metabolomics. However as can be seen in Table 3, these different '-omic' technologies have advantages and disadvantages.

	Transcriptómica <i>Transcriptomics</i>	Proteómica <i>Proteomics</i>	Metabolómica <i>Metabolomics</i>
Fundamentos <i>Foundation</i>	Análise de <i>ca.</i> 25.000 genes através da sua expressão génica (> 25.000 mRNAs) <i>Analyses of about 22,000 genes through their gene expression (> 25,000 mRNAs)</i>	Análise de ? 100.000 proteínas <i>Analyses of ? 100,000 proteins</i>	Análise de <i>ca.</i> 20.000 metabólitos <i>Analyses of about 20,000 metabolites</i>
Vantagens <i>Advantages</i>	❖ Todos os genes podem ser testados <i>All of the genes can be tested</i> ❖ Tecnologia bem estabelecida <i>Well established techniques</i>	❖ Os perfis proteicos podem ser obtidos de fluidos biológicos <i>The protein profiles may be obtained from biological fluids</i> ❖ As proteínas são indicadores mais sensíveis de toxicidade <i>The proteins are more sensitive indicators of toxicity</i>	❖ Indicadores fiáveis do estado actual das células <i>Viable indicators of the current state of the cell</i> ❖ Metabólitos já conhecidos <i>Metabolites are already known</i> ❖ Métodos já estabelecidos e de custos acessíveis <i>Techniques are already known costs are reasonable</i>
Desvantagens <i>Disadvantages</i>	❖ Necessidade de utilização de células e tecidos <i>Need to use cells and tissues</i> ❖ Custos elevados <i>High costs</i>	❖ Não existem técnicas para todas as proteínas <i>No techniques for all the proteins</i>	❖ A resposta metabólica pode estar afastada da origem patológica <i>The metabolic response may be apart from the pathologic origin</i>

Quadro 3 - Comparação das tecnologias de toxicogenómica
Table 3 - Comparison of toxigenomic technologies

A farmacogenômica pode ser considerada como uma parte da toxigenômica especialmente orientada para o estudo dos mecanismos de ação da eficácia e toxicidade dos fármacos. Ela interessa sobretudo aos investigadores ligados à indústria farmacêutica^[30].

Entretanto, a aplicação das novas tecnologias “-ômicas” não fica limitada aos fármacos ou moléculas candidatas a fármacos. Têm igualmente sido aplicadas a outros compostos químicos no âmbito da toxigenômica. É o caso dos estudos de substâncias consideradas como disruptores endócrinos^[31,32], nefrotóxicas^[33], hepatotóxicas^[34], etc..

Bioinformática: biologia computacional

A transcriptômica, bem como a proteômica e a metabolômica, produziram uma grande quantidade de informação que continua em crescimento exponencial. O tratamento global desta informação requer o auxílio da bioinformática ou do que vem sendo designado de ciência computacional. Na realidade, à medida que a informação aumenta, torna-se mais difícil proceder à sua análise e interpretação. Os cientistas são obrigados a trabalhar com quantidades de informação da ordem dos terabytes (1 terabyte equivale a 2^{40} bytes) estando previsto que atinjam valores da ordem dos petabytes (1 petabyte equivale a 2^{50} bytes) num futuro próximo. Tal só é possível com o desenvolvimento da ciência computacional^[35] ou, mais especificamente da biologia computacional^[36].

Presentemente a biologia computacional tornou-se uma ferramenta imprescindível para coordenação e sistematização da enorme quantidade de informação adquirida das novas tecnologias “-ômicas”. Ao mesmo tempo, tornou-se possível a conceptualização de modelos explicativos que integrem a informação recolhida de diferentes bases de dados^[37,38].

A biologia de sistemas é o domínio de actividade em que se procura integrar a informação produzida pelas várias tecnologias com o fim de melhor se entender o funcionamento de sistemas biológicos ao nível biomolecular^[39]. Mediante a análise das relações e interacções entre várias partes dum sistema biológico (e.g. as relações das redes genes/proteínas envolvidas na sinalização das células, vias metabólicas, organitos celulares, sistemas fisiológicos, organismos, etc.), a biologia computacional procura conceptualizar um modelo aproximado do funcionamento global do sistema em estudo (Fig. 2).

Na biologia de sistemas estudam-se os genes, os mRNAs, as proteínas e metabólitos num organismo (através da tecnologias já referidas), de modo a quantificar as alterações da expressão génica em resposta a uma perturbação específica (e.g. exposição a xenobióticos). Com base na informação recolhida são gerados no computador modelos matemáticos interpretativos. Modelos estes que devem posteriormente ser testados para se comprovar a sua validade.

Pharmacogenomics can be considered as a part of toxigenomics especially oriented towards the study of mechanisms of action of efficacy and toxicity of drugs. It deserves the specific interest of researchers, namely of those linked to the pharmaceutical industry^[30].

Meanwhile, the application of new “-omic” technologies, are not limited to drugs or molecules that are drug candidates. It has also been applied to other chemical compounds in the scope of toxigenomics. This is the case of the studies on substances considered as endocrine disruptors^[31,32], nephrotoxics^[33], hepatotoxics^[34], etc..

Bioinformatics: computational biology

Transcriptomics, as well as proteomics and metabolomics, have provided a mass of information, which continues in exponential growth. The global treatment of this information requires the aid of bioinformatics, or as what has become known as computational science. In reality, as the amount of information ads up, it becomes increasingly difficult to proceed with its analysis and interpretation. Scientists are compelled to work with quantities of information in the order of the terabytes and in the near future it is foreseen to reach values in the order of petabytes. that will only be possible with the development of computational science^[35] or, more specifically with computational biology^[36].

Nowadays computational biology became a crucial tool for coordinating and systematizing an enormous quantity of information that is acquired through the new “-omic” technologies. Simultaneously, the conceptualization of explanatory models that integrate the information gathered from different databases became possible^[37,38].

Systems biology is the domain of activity that attempts to integrate information produced from various technologies in order to better understand the functioning of biological systems at a biomolecular level^[39]. By analyzing the relationship and interaction between the several parts of a biological system (e.g. the relationships of gene/protein networks involved in cellular signals, metabolic paths, cellular organites, physiological systems, organisms, etc.), computational biology attempts to conceptualize an approximate model of the global functioning of the system under study (Fig.2)

In systems biology, one studies the genes, mRNAs, proteins and metabolites in an organism (through the technologies already referred), in order to quantify the alterations of gene expression in response to a specific disturbance (e.g. exposure to xenobiotics). On grounds of the information gathered, mathematical explanatory models of the verified alterations are generated computationally. These models are afterwards tested to verify their validity.

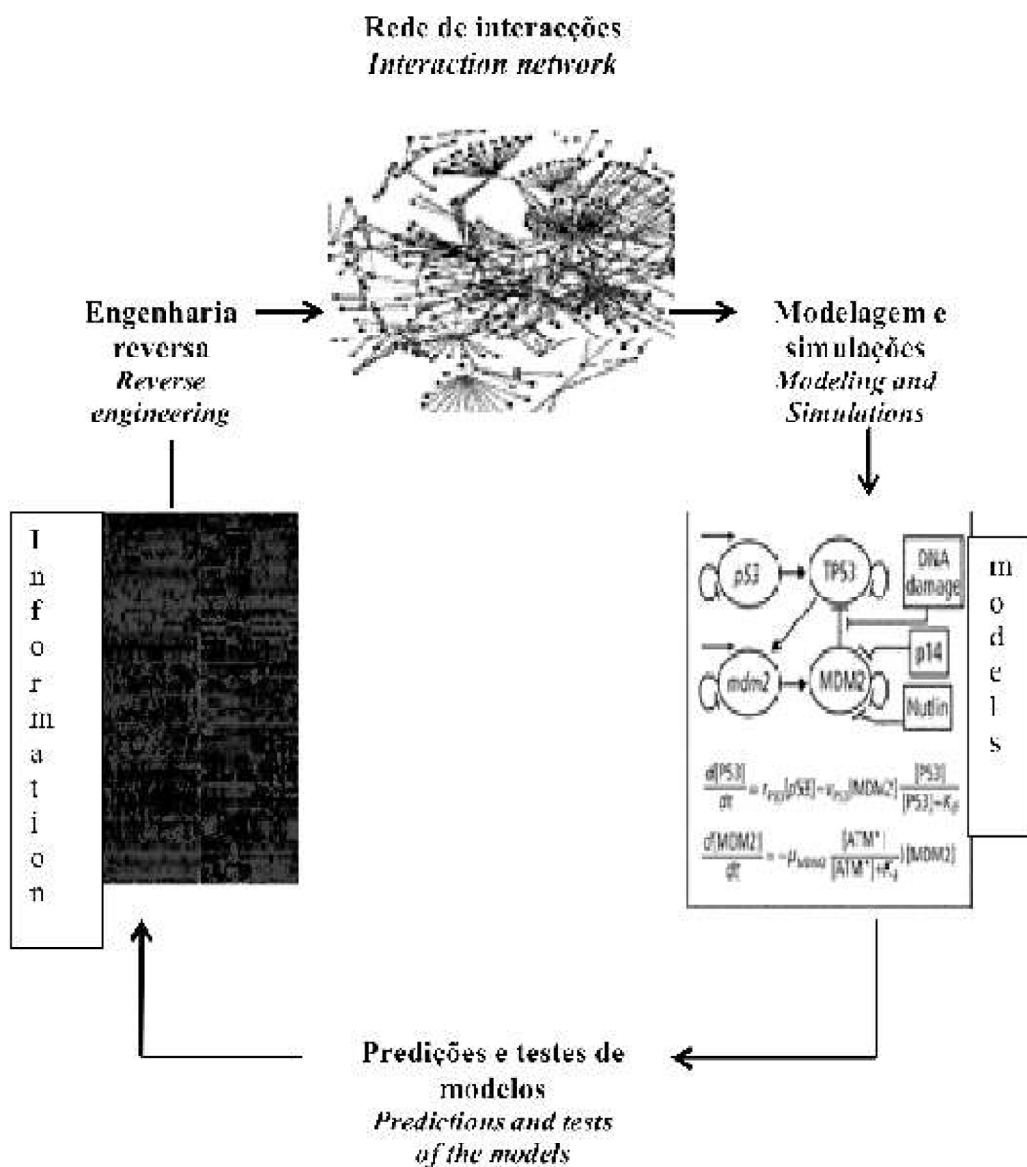


Figura 2 - Processo iterativo na biologia de sistemas (adaptado de³⁸)
Figura 2 - Iterative process in systems biology (adapted from³⁸)

Em resumo, trata-se dum processo iterativo que envolve a participação multidisciplinar da biologia molecular, biologia computacional, estatística, matemática, ciência computacional, bioquímica, física, etc.

In summary, it is an iterative process that involves the multidisciplinary participation of molecular biology, computational biology, statistics, mathematics, computer science, chemistry, biochemistry, physics, etc.

Conclusão

É incontroverso o interesse da aplicação das tecnologias genómicas ao estudo da toxicologia de compostos químicos, tal como se demonstra pela emergência da toxigenómica^[40,41,42].

As indústrias farmacêutica, de cosméticos e de aditivos alimentares contam-se entre as mais interessadas na validação destas técnicas. Elas poderão vir a tornar-se alternativas ou complementares das correntemente utilizadas nos protocolos de avaliação da toxicidade.

Por outro lado, considerando o interesse dos organismos internacionais em defender a saúde humana e o meio ambiente da acção de milhares de compostos químicos, sobre os quais a informação toxicológica é escassa, existe a necessidade de investir esforços para serem encontrados métodos científicos válidos que possam colmatar aquela falta de informação.

Neste contexto, várias entidades reguladoras tais como a FDA (Food and Drug Administration)^[43] e a OCDE^[44] já demonstraram interesse em apreciar novos métodos de avaliação de produtos submetidos para aprovação.

Uma vez que a quantidade de informação produzida já é significativa, em consequência da aplicação das novas tecnologias, é inevitável que se torne necessário recorrer à bioinformática para tratamento e arquivo da mesma em bases de dados. Ao nível internacional, foram criados vários centros dedicados a estudos toxigenómicos. Nos EUA, por exemplo, existe o National Centre for Toxigenomics do NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences). O seu objectivo principal é utilizar as tecnologias de análise da expressão genómica global para definir a melhor política no sentido de defender a saúde humana e o meio ambiente^[45,46,47]. Têm sido desenvolvidos esforços para recolher de forma sistemática os resultados obtidos dos diferentes centros dedicados à investigação em toxigenómica^[47].

É de esperar que, num próximo futuro, a toxigenómica se torne numa ciência de grande utilidade para a compreensão dos mecanismos de doenças causadas pela poluição ambiental e, ao mesmo tempo, contributiva para a sua prevenção^[48].

Conclusion

The interest in the application of genomic technologies to the study of the toxicology of chemical agents is uncontroversial, as expressed by the emergence of toxicogenomics^[40,41,42].

Pharmaceutical, cosmetic and food additive industries are amongst those most interested in the validation of these techniques. They may become alternative techniques or complementary ones to the current toxicity evaluation protocols in use.

However, considering the interest of international organizations in defending human health and the environment from the action of thousands of chemical compounds, and which scarce information on toxicity is available, there is a need to endeavour efforts in order to find scientific methods that are valid in order to bridge this gap.

Along these lines, several regulatory entities such as the FDA (Food and Drug Administration)^[43] and e a OCDE^[44] have already demonstrated an interest in considering new evaluation methods for the products that are subject to approval.

Since the quantity of information produced is already significant, due to the data gathered through the application of these innovative technologies, it is inevitable that we resort to bioinformatics to treat that information and archive it in databases. At an international level, several research centres dedicated to the study of toxigenomics have been created. In the US, for example, there is the National Centre for Toxigenomics, of the NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences). Its main aim is to use technologies of global genomic expression to define the best policies for defending human health and the environment^[45,46]. Efforts have been developed in the construction of databases the collect in a systematic way the results obtained from the different centres dedicated to research in toxigenomics^[47].

It is hoped that in the near future toxigenomics will become a valuable aid in the understanding of the mechanisms of illnesses caused by environmental pollution, while simultaneously contributing to their prevention^[48].

Referências / References

- [1] Roe, D., Pease, Florini, K. & Silbergeld, E. Toxic ignorance. (ed. Roe, D.) 1-65 (The Environmental Defense Fund, Inc., 1997).
- [2] European Commission. The Strategy for a future Chemicals Policy REACH. (2006).
- [3] Meier, H. *Experimental Pharmacogenetics. Physiopathology of Heredity and Pharmacologic Responses*, (Academic Press, New York, 1963).
- [4] Goldberg, A. & Hartung, T. Protecting more than animals. *Sci Am* **January**, 84-53 (2006).
- [5] Russell, W. & Burch, R. *The Principles of Humane Experimental Technique*, (The Johns Hopkins Center, Baltimore, 1959).

- [6] European Commision. EU approves new alternatives to animal testing of drugs and chemicals. In *Medical News Today* Vol. 2006 (2006).
- [7] Jung, H. & Choi, S. Sequential method of estimating the LD50 using a modified up-and-downrule. *J Biopharm Stat* **4**, 19-30 (1994).
- [8] Anónimo. One-upping the LD50. *Environ Health Perspect* **106**, A484 (1998).
- [9] OECD. OECD Test Guideline 401 will be deleted: a major step in animal welfare: OECD reaches agreement on the abolishment of the LD50 acute toxicity test. (OECD, 2002).
- [10] ECVAM. European Center for the Validation of Alternative Methods. (2006).
- [11] Sulston, J. & Ferry, G. *The Common Thread*, (Bantam Press, London, 2002).
- [12] Farr, S. & Dunn, R. Concise Review: Gene Expression Applied to Toxicology. *Toxicol Sci* **50**, 1-9 (1999).
- [13] Venter, J.C. et al. The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
- [14] IHGMC. A physical map of the human genome. *Nature* **409**, 934-941 (2001).
- [15] The International HapMap, C. A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**, 1299-1320 (2005).
- [16] Phimister, E.G. Genomic Cartography -- Presenting the HapMap. *N Engl J Med* **353**, 1766-1768 (2005).
- [17] Imanishi, T. et al. Integrative Annotation of 21,037 Human Genes Validated by Full-Length cDNA Clones. *PLoS Biology* **2**, 162 (2004).
- [18] Boorman, G. et al. Toxicogenomics, Drugs Discovery, and the Pathologist. *Toxicologic Pathology* **30**, 15-27 (2002).
- [19] Kaminski, N., Allard, J. & Heller, R. Use of oligonucleotide arrays to analyze drug toxicity. *Ann NY Acad Sci* **919**, 1-8 (2000).
- [20] Steiner, G., Suter, L., Boess, F., Gasser, R. & al, e. Dicriminating different classes of toxicants by transcript profiling. *Environ Health Perspect* **112**, 1236-1248 (2004).
- [21] Cunningham, M.L. & Lehman-McKeeman, L. Applying toxicogenomics in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci* **83**, 205-206 (2005).
- [22] Dufva, M. Production of DNA microarrays for biomedical research. *Bio Tech Internacional* **18**, 12-15 (2006).
- [23] Aebersold, R., Rist, B. & Gygi, S. Quantitative proteome analysis. Methods and applications. *Ann NY Acad Sci* **919**, 33 (2000).
- [24] Steiner, S. & Anderson, N. Pharmaceutical proteomics. *Ann NY Acad Sci* **919**, 48-51 (2000).
- [25] Wetmore, B. & Merrick, B. Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicol Pathol* **32**, 619-642 (2004).
- [26] Fields, S. PROTEOMICS: Proteomics in Genomeland. *Science* **291**, 1221-1224 (2001).
- [27] Joos, T. Protein microarray technology. *Expert Review of Proteomics* **1**, 1-3 (2004).
- [28] Schmidt, C. Metabolomics. *Environ Health Perspect* **112**, A410-415 (2004).
- [29] Nicholson, J., Connelly, J., Lindon, J. & Holmes, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Disc* **1**, 153-161 (2002).
- [30] Ross, J. & Ginsburg, G. The integration of molecular diagnostics with therapeutics. *Am J Clin Pathol* **119**, 26-36 (2003).
- [31] Terasaka, S., Aita, Y., Inoue, A., Hayashi, S. & al., e. Using a customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. *Environ Health Perspect* **112**, 773-781 (2004).
- [32] Shirai, T. & Asamoto, M. Application of toxicogenomics to the endocrine disruption issue. *Pure Appl Chem* **75**, 2419-2422 (2003).
- [33] Amin, R., Vickers, A., Sistare, F., Thomppson, K. & al., e. Identification of putative gene - based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 465-479 (2004).
- [34] Stierum, R., Heijne, W., Kienhuis, A., Van Ommen, B. & Groten, J. Toxicogenomics concepts and applications to study hepatic effects of food additives and chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 179-88 (2005).
- [35] Microsoft. Towards 2020 Science. (2006).
- [36] Roos, D. Computacional Biology: Bioinformatics-- trying to swim in a sea of data. *Science* **291**, 1260-1261 (2001).
- [37] Erickson, B. Making Sense of Toxicogenomic Data. in *Environmental Science and Technology* (2003).
- [38] Stolovitzky, G. & Stolovitzky, A. Systems Biology - making sense of oceans of biological data. *Update*, 20-23 (2006).
- [39] Brent, R. & Bruck, J. 2020 Computing: Can computers help to explain biology? *Nature* **440**, 416-417 (2006).

- [40] Pennie, W.D., Tugwood, J.D., Oliver, G.J.A. & Kimber, I. The Principles and Practice of Toxicogenomics: Applications and Opportunities. *Toxicol Sci* **54**, 277-283 (2000).
- [41] Orphanides, G. & Kimber, I. Toxicogenetics: Applications and Opportunities. *Toxicol Sci* **75**, 1-6 (2003).
- [42] Fielden, M. & Zacharewski, T. Challenges and limitations of gene expression profiling in FDA. Guidance for Industry. Pharmacogenomic Data Submissions. (ed. Services, U.S.D.H.H.) 1-25 (FDA, Rockville, 2005).
- [44] OECD. OECD Activities to Explore and Evaluate Regulatory Application of Genomic Methods: Toxicogenomics. (ed. OECD) (OECD, 2002).
- [45] NIEHS. National Center for Toxicogenomics to study genetic basis of diseases caused by environmental pollution. in *Risk World* (North Carolina, 2000).
- [46] NCT. Using Global Genomic Expression technology to Create a Knowledge Base for Protecting Human Health. (ed. Sciences, N.I.o.E.H.) (National Institutes of Health, 2000).
- [47] Mattes, W., Petit, S., Sansone, S.-S., Bushel, P. & Waters, M. Database development in Toxicogenomics: issues and efforts. *Environ Health Perspect* **112**, 495-505 (2004).
- [48] Balbus, J. Ushering in the new toxicology: toxigenomics and the public interest. *Environ Health Perspect* (2005).