

Enfermedades moleculares hereditarias

(Errores congénitos) (*)

Por el Dr.

EUGENE KNOX (**)

La propiedad más notable de las enfermedades moleculares hereditarias es que ellas nos revelan con gran exactitud una parte de la maquinaria de la vida, de la cual no estamos conscientes mientras ella realiza tranquilamente su función. Son ablaciones moleculares que tienen una precisión mucho mayor que la relativamente tosca extirpación de todo un órgano como por ejemplo una glándula endocrina, y mucho mayor aún que un bloqueo metabólico originado por déficits vitamínicos o por antimetabolitos, que pueden afectar toda una serie completa de reacciones conexas. A través de los años estos diversos, bizarros y a menudo raros "experimentos de la naturaleza" han sido observados y reportados. Los conocimientos acerca de ellos se han ido acumulando lentamente, a menudo almacenados por algunos con la devoción del verdadero amateur. Una de estas personas lo que Sir Archibald E. Garrod, que fue el primero en adherirse a la idea de un control hereditario de las etapas individuales que tienen lugar en el metabolismo

lo cual da lugar a veces lo que él llamó errores congénitos del metabolismo. Más recientemente la fusión de las ciencias naturales, especialmente la bioquímica y la genética con la química molecular y la física ha hecho posible una aún mayor conceptualización de toda esta área, desde la información genética hasta su expresión en un individuo con los signos y síntomas clínicos de una enfermedad.

Una consecuencia de este avance lo constituye la feliz introducción del término preferiblemente adecuado para estas condiciones: el de enfermedades moleculares hereditarias. En el momento actual nuestra intención didáctica es la de indicar todos los aspectos de la enfermedad tanto su transmisión como su manifestación en términos moleculares, es decir en cuanto a las propiedades de la estructura y de la función de las moléculas químicas. El desarrollo histórico de este concepto ilustra mejor que nada los extraordinarios logros que están siendo ahora realizados, lo cual puede ser seguido durante todo su curso a través de los estudios particularmente iluminadores de solo unas pocas enfermedades: alcaptonuria, anemia por hematíes falciformes y fenilketonuria.

(*) Artículo aparecido en la *Borden's Review of Nutrition Research* Vol 20: 23-38, 1959.

(**) Assistant Professor of Biological Chemistry, Harvard University School of Medicine, Boston, Mass.
Traducción del Dr. E. Alemán.

"Los errores congénitos del metabolismo".

En el momento de escribir este artículo hacen justamente cincuenta años desde la aparición del pequeño volumen de Garrod titulado "The Inborn errors of Metabolism". Pero la génesis de la idea expuesta en esta clásica discusión de cuatro enfermedades (alcaptonuria, albinismo, cistinuria y pentosuria) tuvo lugar algunos años antes durante el estudio de una de ellas, la alcaptonuria que es el prototipo de los errores congénitos del metabolismo.

Alcaptonuria.

La historia moderna y el nombre de esta enfermedad comenzó en 1859 cuando Bödecker recibió para su examen una muestra de orina de un hombre de 44 años que sufría de un dolor artrítico lumbar que lo incapacitaba para el trabajo. (Al principio se creyó que tenía diabetes porque la orina reducía la solución de Fehling utilizando el test standard para investigar azúcar. Pero cuando Bödecker alcalinizaba la orina previamente a la realización del test, al contrario de lo que pasa en la orina diabética, se volvía negra desde la superficie hacia el fondo del tubo y absorbía más de su propio volumen de oxígeno. La sustancia que se encontraba en la orina y que resultaba responsable de este curioso fenómeno fue denominada "alkapton" mediante la combinación de la palabra arábiga que significa álcali y la palabra griega que significa "absorber (oxígeno) vorazmente".

Posteriormente fue identificada dicha sustancia como ácido homogentísico*, un compuesto fácilmente oxidable por el aire para formar un polímero negro y químicamente en relación con la hidroquinona, usada para revelar placas

(*) Antes llamado ácido glucosúrico, el ácido homogentísico es un intermediario en la oxidación de la tirosina y la fenil-alanina.

fotográficas. La película fotográfica expuesta se ennegrece efectivamente mediante una gota de orina de un paciente alcaptonúrico. Este es uno de los tests más simples para revelar dicho ácido. Pieter (1925) jocosamente advirtió que su paciente con esta enfermedad supuestamente inofensiva sacaba fotografías, puesto que no tenía necesidad de usar reveladores comerciales.

El ennegrecimiento de la orina cuando se la deja reposar y el manchado de las ropas con ella humedecidas es una manifestación bizarra típica de este error congénito del metabolismo. Según Garrod, estas enfermedades "anuncian su presencia de cierto modo conspicuo, ya mediante un aspecto notablemente inusual de los tejidos superficiales o de las excretas, por la excreción de alguna sustancia que responde a algún test habitualmente aplicado en el trabajo clínico de rutina, o dando origen a síntomas morbosos obvios". El valor de signos tales está implícito en el diagnóstico retrospectivo de esta condición que Garrod hizo en sus primeros artículos médicos y que transcribimos como un ejemplo de su estilo característico.

"Hasta los primeros años del siglo 19, no se había establecido distinción alguna en los artículos médicos entre las orinas que eran negras al emitirse y las que se ennegrecían por la exposición al aire, pero es difícil sugerir ningún otro diagnóstico que el de alcaptonuria en algunos casos referidos en artículos de los siglos 16 y 17, tales el mencionado por G.A. Scribonius (en 1584) de un escolar que, aunque gozaba de buena salud, eliminaba continuamente orinas negras, y el citado por Schenck (en 1609) de un monje que presentaba una peculiaridad semejante y decía que había padecido de ella toda su vida. El record más interesante de esta clase es el que encontramos en el artículo de Zacutus Lusitanus, publicado en 1649. El paciente era un mu-

chacho que eliminaba orinas negras y que, a la edad de 14 años, fue sometido a un curso drástico de tratamiento que tenía por objeto dominar el fiero calor de sus vísceras que se suponía ocasionara la condición que presentaba carbonizando y entrecreciendo su bilis. Entre las medidas que se prescribían había sangrías, purgantes, baños, una dieta fría y líquida y abundancia de drogas. Ninguna de ellas tenía algún efecto obvio, y eventualmente el paciente, cansado de la terapéutica tan fútil como superflua, resolvía dejar las cosas seguir su curso natural. Ninguno de los infortunios predichos tuvo lugar, tuvo una larga familia y vivió una prolongada y muy saludable existencia, siempre orinando un líquido negro como la tinta”.

Garrod, que fuera luego sucesor de Sir William Osler como el *Regius Professor* de Medicina de Oxford, era un pediatra por el tiempo que publicara su primer artículo sobre la alcaptonuria. Como pediatra, vio la unidad familiar completa de sus pacientes más claramente que los médicos de otras especialidades son aptos para hacerlo. Su primer artículo añadió 5 casos a los 23 entonces conocidos ejemplos de alcaptonuria, y confirmó el hecho de que esta rara enfermedad podía ser encontrada en varios miembros de una misma familia. Específicamente ocurrió entre miembros de la misma fratria, pero no en sus padres ni en sus vástagos. Había una “predisposición muy especial para que ocurriera alcaptonuria en los hijos de los primos de primer grado”. La importancia de estos hechos no resultó claro inmediatamente porque las leyes de Mendel no fueron re-descubiertas hasta el año siguiente. Garrod continuó, sin embargo, recogiendo fragmentos particulares de información sobre esta enfermedad que se hallaba de modo raro fuera de los senderos de la investigación co-

rriente. El historió, pañal por pañal, la aparición de orinas “que manchaban” en niños recién nacidos, estableciendo de ese modo que la anomalía era de duración de por vida y que era por tanto congénita. Los experimentos de alimentación lo convencieron de que el aminoácido tirosina, conocido como la fuente del ácido homogentísico, debía ser absorbido y convertido en este último producto a través del metabolismo orgánico debido al tiempo que transcurría antes de que comenzara la excreción y no, como entonces se creía, por fermentación en el intestino. (Figura 1).

Cuando Bateson publicó en 1902 “Los Principios de la Herencia de Mendel”, ya Garrod había reunido los datos antes mencionados sobre la alcaptonuria, viéndose inmediatamente con toda claridad que un raro factor hereditario recesivo del tipo postulado por Mendel podía explicar perfectamente esta alteración congénita del metabolismo: “Lo que puede describirse como un “capricho” del metabolismo, una anomalía química más o menos análoga a las malformaciones estructurales”. Esta clase de herencia podría explicar la ocurrencia familiar observada.

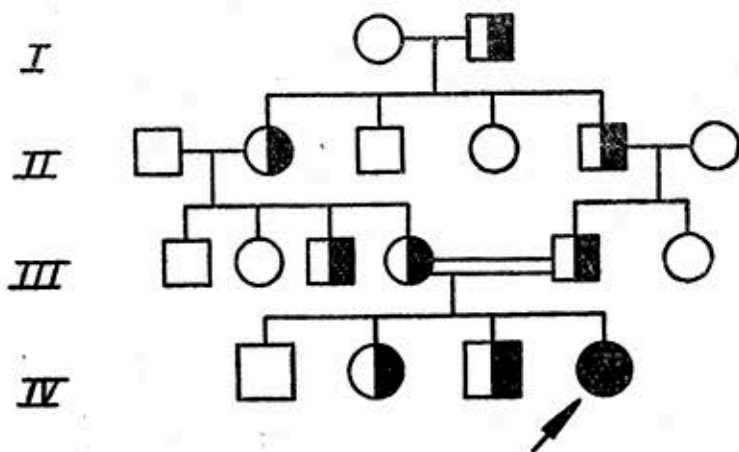
En opinión de Garrod, no existe razón alguna para suponer que la mera consanguinidad de los padres pueda originar condiciones tales como la alcaptonuria en sus vástagos, por lo que se debe buscar más bien alguna explicación en cierta peculiaridad de aquellos, que puede quedar latente durante generaciones, pero que ofrece la posibilidad de presentarse en el producto de la unión de dos miembros de familias a través de las cuales es transmitida la anomalía.

En ese tipo de familia, ilustrada por el *pedigree* de la figura 1, los efectos de un gen aislado “recesivo” no son manifiestos, y puesto que es un gen

raro, ambos padres son más susceptibles de poseerlo si el matrimonio se efectúa entre miembros de la misma familia. Cuando esto ocurre, la enfermedad aparece en la proporción de uno de cada cuatro niños, pudiendo ocurrir posiblemente en varios niños, y solo raramente habrá antecedentes familiares de la misma enfermedad en otras generaciones. La alcaptonuria fue la primera condición humana o animal reconocida como cumpliendo las leyes de Mendel.

estaba enfermo. El claro acoplamiento hecho por Garrod del control hereditario con las todavía hipotéticas reacciones enzimáticas del metabolismo intermediario constituyó la clave de la alcaptonuria, la base de su concepto sobre los errores congénitos. Ello representó el nacimiento de lo que ahora conocemos como genética bioquímica, lo cual se condensa en la frase: un gen = un enzima. El porqué el ácido homogentísico, formado en el curso del metabolismo de la tirosina es excretado

FIGURA 1



LEY DE MENDEL SOBRE LA HERENCIA

PEDIGREE típico demostrativo de la transmisión de un gen anormal sencillo acerca de la mitad de los miembros de las generaciones II y III y un matrimonio entre primos hermanos de la generación III que eran portadores. La enfermedad (flecha) puede aparecer entonces en la generación IV, en un promedio de $\frac{1}{4}$ de los miembros de la fratria y usualmente solo en las fratrias de esa generación. Alternativamente, el mismo diagrama puede representar los complementos normales y anormales de una proteína específica en los individuos de la familia.

La teoría de los errores innatos establecía una segunda suposición además de la herencia recesiva de la anomalía química, y era que: el metabolismo ocurre por etapas discretas, susceptibles de control hereditario. La opinión popular por esa época era que el metabolismo era como una llama que ardía mejor en plena salud y se reducía en intensidad cuando el sujeto

por los alcaptonúricos fue explicado por Garrod de este modo:

“El concepto del metabolismo en bloque va dando paso al del metabolismo por compartimientos. Cada día gana más terreno la opinión de que cada etapa sucesiva en la formación así como en la desintegración, no solo de las proteínas, de los carbohidratos y de las grasas en general, sino hasta de las frac-

ciones individuales de proteínas y de azúcares aislados, no es más que el producto de la acción de enzimas especiales que actúan separadamente para cada objetivo especial.

Si cualquiera de los pasos que deben sucederse en el proceso falla, el producto intermediario correspondiente al punto de detención escapará a toda modificación ulterior del mismo modo que cuando la película de un cinematógrafo se interrumpe en su rodaje, las figuras antes en movimiento se quedan con un pie en el aire. Todo lo que se sabe del curso del catabolismo tiende a demostrar que en tales circunstancias el producto intermediario suele excretarse como tal.

Los trabajos subsiguientes han seguido las ideas generales de Garrod sobre la herencia y el metabolismo habiéndose confirmado completamente su opinión particular sobre la alcaptonuria. Esta es una enfermedad rara, estimándose su frecuencia entre 1 por cada 250.000 y 1 por cada 10.000.000 de personas, rareza que se manifiesta además por la alta incidencia de consanguinidad (42%) entre los padres de los pacientes. Los *pedigrees* mejor estudiados son típicos de una transmisión recesiva. La desintegración enzimática por pasos de la tirosina pasando por el ácido homogentísico hasta los componentes del ácido cítrico es un ciclo bien conocido en todos sus detalles, y el enzima que produce la oxidación del ácido homogentísico normalmente no se encuentra en el hígado de los pacientes alcaptonúricos. El ácido homogentísico se acumula por lo tanto en proporción a la proteína contenida en la dieta. Se excreta por la orina y origina el ennegrecimiento de la misma antes descrito. Muchos casos son todavía confundidos al principio con la diabetes a causa de la misma confusión que originalmente tuvo Bödecker hace cien años. El acúmulo de ácido

homogentísico en los tejidos corporales es pequeña, pero aún esa escasa porción resulta también oxidada para formar el negro polímero. A través de los años éste se deposita selectivamente en ciertos tejidos mesenquimatosos, manifestándose hacia la edad mediana del paciente por el ennegrecimiento de los cartílagos y tendones conocidos con el nombre de ocronosis. También puede verse clínicamente como una discoloración azulosa de la esclerótica, en los cartílagos de la oreja y en los tendones superficiales. La única consecuencia morbosa de la enfermedad es la tendencia de estas estructuras coloreadas a desintegrarse, resultando en una artritis incapacitante después de la mediana edad. Esta fue indudablemente la causa del dolor lumbar en el caso original de Bödecker.

Lo típico de estas enfermedades es que abren nuevos horizontes para los investigadores, estando todavía por explorar la posible explicación que pueda darnos acerca del indeterminado mecanismo de la artritis. Thannhauser parafraseó esta explicación provocativamente así:

"La artritis de la alcaptonuria es particularmente instructiva para la patología general porque tenemos en ella un metabolito endógenamente producido cuya estructura química es completamente conocida, dando origen a una enfermedad articular deformante. Queda por tomar solamente un paso para sugerir que en la artritis *deformans*, mucho más frecuente, de etiología desconocida habrá otro metabolito endógeno que actúe igual que lo hace el ácido homogentísico para producir las alteraciones articulares".

Las conclusiones del artículo clásico de Garrod "La incidencia de la alcaptonuria: un estudio de individualidad química" comprendían un epítome de los errores innatos del metabolismo, detallando brevemente las característi-

cas salientes de un nuevo grupo de enfermedades, aunque solo se conocía un solo ejemplo: una desviación conspicua y específica que ocurría entre hermanos y hermanas, a menudo productos de matrimonios entre primos hermanos. El albinismo y la cistinuria, según creía él, podían ser otras enfermedades del mismo grupo. En sus *Croonian lectures* (1909) ordenó las evidencias disponibles sobre este punto de vista y agregó una cuarta enfermedad: la pentosuria.

Albinismo completo universal

Mientras el albinismo corresponde indudablemente al grupo que estamos discutiendo, nuestros conocimientos sobre el mecanismo químico que le competen son menos completos que lo que se esperaba. No podemos, sin embargo, confirmar la opinión de Garrod de que sea simplemente la falta de un enzima que usualmente forma pigmento, y que el déficit del producto más bien que el acúmulo del sustrato como en la alcaptonuria responde de las características principales de la enfermedad.

Hay muchas clases de déficits pigmentarios en los seres humanos, a veces asociados con otras anomalías graves, que a menudo no se distinguen claramente de la entidad característica del albinismo. El albinismo es una condición pura y simple: falta de virtualmente todo el pigmento melánico del pelo, piel y ojos. Las únicas complicaciones, tales como quemaduras del sol y anormalidades de la visión, son aquellas causadas por inadecuada protección contra la luz solar. El albinismo completo expresa precisamente un modo recesivo de herencia, habiendo pocas evidencias en el hombre de la gran variedad de genes alélicos (*) y no

(*) Uno de un par o cualquiera de una serie de genes que tienen el mismo locus en cromosomas homólogos.

alélicos para el albinismo como ocurre en otros animales.

La melanina que es un polímero par-duzco insoluble de constitución química desconocida se forma en unas células específicas: los melanocitos. Se forma probablemente a partir de la tirosina por medio de la tirosinasa. Estos melanocitos emigran de la cresta neural durante el desarrollo embriológico hacia los sitios que deberán aparecer pigmentados. La exclusión de dichas células en un sitio determinado resulta en albinismo localizado. W.K. Silvers (1957-1958) demostró que las "células claras" de bulbos pilosos de las ratas albinas eran melanocitos amelanóticos, pero también eliminó que hubiera evidencias de que melanocitos amelanóticos estuvieran presentes en los albinos humanos. La mejor indicación de su presencia estriba en la conocida ocurrencia de melanomas amelanóticos en dos albinos humanos. Sobre esta ligera evidencia se apoya la opinión de que el defecto es subclular, posiblemente debido a inactividad de la tirosinasa.

Los "tests" histoquímicos denominados "DOPA oxidasa" son en efecto negativos en los tejidos albinos. Sin embargo, la determinación de la tirosinasa de los mamíferos que posee actividad "DOPA oxidasa" se complica por la necesidad de activarla durante algunos días por irradiación /o por la cupresión de los compuestos SH. No está, sin embargo, determinado si el enzima está ausente en los albinos humanos o si alguna anormalidad celular impide la formación de pigmento.

Cistinuria

El tercero de los errores congénitos del metabolismo de Garrod proveyó a la ciencia con su primera fuente de cistina en los cálculos urinarios constituidos de la sustancia pura caracte-

rística de esta alteración. El estudio de los pacientes reveló además el ciclo del metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre, aunque no hay bloqueo enzimático en este ciclo metabólico como pensó Garrod. Un sistema específico de transporte del riñón falla en conservar la cistina como debe hacerlo normalmente y ésta se pierde por la orina. Esta reciente solución del problema de la cistinuria, que se admitía desde el tiempo de Garrod ser debida a un defecto metabólico, forzó a extender el concepto original de aquél llegando a incluir defectos hereditarios en otros sistemas funcionales además de los enzimas. Es también la única de las cuatro enfermedades descritas por Garrod cuya transmisión hereditaria no resulta siempre puramente recesiva. Cerca de un tercio de las familias con cistinuria presentan una variedad llamada "incompletamente recesiva" en la cual los portadores de un solo gen de cistinuria (los heterocigóticos) pueden distinguirse por la excreción de cantidades moderadamente elevadas de cistina y lisina. Estos individuos explican la alta incidencia de "cistinuria química" (1:250) detectable por análisis, en contraste con la poca frecuencia (1:80.000) de los excretores homocigóticos de grandes cantidades de cistina.

En la cistinuria de ambas variedades hay reabsorción tubular renal defectuosa en lo que respecta a lisina, cistina, arginina y ornitina. Estos aminoácidos, dos de ellos más o menos esenciales para el organismo, son excretados por la orina en cantidades anormales durante toda la vida. Solo la excreción del menos soluble, la cistina, vino a ser reconocida durante años recientes, y tanto el nombre como la importancia clínica de la condición son referibles a este aminoácido exclusivamente. La única consecuencia clínica parece ser la formación frecuente de

cálculos urinarios compuestos casi solamente de cistina pura. La mayoría de los sujetos homocigóticos para el gen de la cistinuria forman más tarde o más temprano dichos cálculos, los cuales tienden a recidivar. Las secuelas pueden conducir eventualmente a la insuficiencia renal y a la muerte.

Pentosuria

El último de los errores congénitos del metabolismo de Garrod es reconocido solamente debido a que los tests rutinarios para determinar azúcar en la orina lo revelan. Excepto los primeros 30 casos más o menos conocidos en los tiempos de Garrod y que fueron estudiados imperfectamente, y excepto algunas excreciones menores y usualmente temporales de distintas pentosas, casi todos los casos conocidos de pentosuria se ajustan al patrón característico de una entidad patológica aislada. Esta condición se hereda a través de un gen autosómico (*) recesivo simple, hallándose casi enteramente limitado a sujetos judíos, pero algunos pacientes de origen mediterráneo o europeo no pertenecientes a la raza judía han sido descritos. Su frecuencia no excede de 1 por cada 50.000 personas de la población general, y probablemente más alta en una población de judíos puros.

La enfermedad consiste en la excreción constante por la orina desde la infancia y durante toda la vida, casi independientemente de los cambios en la dieta, de unos 2.0 a 3.5 g. diarios del azúcar reductor L-xilulosa. No hay anormalidades metabólicas o clínicas notables, y los sujetos afectados tienen una probabilidad de supervivencia normal. En muchos casos se han notado síntomas de neurastenia, pero una aso-

(*) Cualquier gen recesivo regular en contraposición con un gen sexual.

ciación definida de tales síntomas con la enfermedad no ha sido observada. A menudo estos son referibles al temor inicial causado por la sospecha de diabetes cuando se encuentra el azúcar en la orina.

Recientes estudios del metabolismo de la pentosa han revelado las reacciones por las cuales se forma la L-xilulosa y es separada para formar parte del metabolismo del ácido D-glucurónico. Hiatt (1958) halló que la llamada glucuronolactona no daba origen a la llamada ribosa en los pentosúricos como sucedía en los controles normales. La L-xilulosa es reducida normalmente a xilitol, antes de su conversión en ribosa. Los intentos de Touster y de Harvell (1958) por localizar el bloqueo antes o después del xilitol midiendo este alcohol de azúcar resultó en el descubrimiento inesperado de la excreción de la L-arabitol en los pentosúricos. Ninguno de estos resultados demostró definitivamente que existiera un bloqueo en el metabolismo, pero caso de haberlo es posible que sea en el paso de la formación del xilitol. La posibilidad alternativa de un mecanismo renal para explicar la excreción igual que la que ocurre en la cistinuria no ha sido ensayada.

Otros "errores congénitos del metabolismo"

La segunda edición del libro de Garrod agregó breves informes sobre hematóporfiria y sobre esteatorrea congénitas a las cuatro enfermedades originales de este grupo. Subsiguientemente se ha reconocido que cierto número de otras enfermedades encuadran también en este mismo grupo general, aunque pocos autores han tenido la temeridad de etiquetarlas explícitamente como "errores congénitos del metabolismo". En verdad el término es demasiado restringido, siendo la opinión

moderna que la enfermedad original, así como las últimas de este grupo, pueden ser definidas mucho más correctamente bajo el título general y amplio de "enfermedades moleculares hereditarias".

Ninguna de las características sobresalientes que permitieron a Garrod aislar sus errores congénitos del metabolismo son cualidades esenciales de estas enfermedades. No es preciso que ellas sean anomalías raras; algunas diferencias químicas hereditarias tales como los grupos sanguíneos se reconocen ahora que afectan a la mitad de la población. No es necesario que sean condiciones recesivas —en efecto se está comprendiendo que toda condición es "recesiva"— (no manifiesta en el heterocigótico con un solo gen anormal) solamente si la anomalía molecular básica no es investigada. Garrod mismo estaba consciente de que la anomalía no precisaba ser conspicua. Las anomalías que él estudió eran simplemente las más obvias. Diferencias muy sutiles son ahora descubiertas regularmente por los análisis sofisticados que se usan en el trabajo clínico de rutina. Y, finalmente, como se dijo al tratar de cistinuria, el defecto primitivo no precisa que envuelva o afecte un enzima de metabolismo. Parece que casi toda macromolécula funcional, ciertamente casi toda proteína funcional, puede estar bajo control hereditario. Literalmente existen miles de funciones unitarias que integran los procesos vitales de las células, y cada una depende del rol de una molécula específica. La conclusión más certera del estado actual de opinión es: un gen = una función. La esfera de acción que aquí se contempla para las condiciones de este tipo comprende los modos mayores y menores en que unos individuos difieren de los otros.

Las enfermedades moleculares hereditarias

Nosotros podemos hablar ahora con alguna autoridad, aunque todavía solo en términos generales, acerca de la base molecular de las condiciones hereditarias que se acaban de discutir. El gen, originalmente una unidad hipotética de herencia, es una subdivisión a lo largo de una cinta en espiral de deoxiribonucleoproteína que constituye el cromosoma de la célula. Los aspectos esenciales de esta estructura son las cuatro bases: adenina, guanina, citosina y timina, colocadas en un orden particular a lo largo de una armazón química sencilla. Usando las letras iniciales de las bases resulta claro que una secuencia particular — tal como A—G—A—T—G—C— podrían representar una información en clave. La clave no ha sido todavía quebrada, pero es razonable que secuencias particulares de tres bases descifren cada uno de los 21 aminoácidos utilizados en la síntesis proteica. Un gen, por lo tanto, no es más que una porción suficiente de la cinta que pueda contener una "oración" con tales "palabras", una sentencia que ofrezca la secuencia de aminoácidos para una proteína determinada. Un gen mutante tendrá, pues, una alteración en cierto modo de la secuencia contenida a lo largo de la cinta. Es conveniente imaginarse estas cintas como análogas a las cintas perforadas que se utilizan en los computadores para dar las informaciones e instrucciones. La duplicación de las cintas ocurre en las mitosis celulares para transmitir la información a las generaciones sucesivas, siendo probable que se hagan "copias de trabajo" de ácido nucleico para la verdadera labor de síntesis de las proteínas dentro de la célula.

Ya no se necesita pensar que la síntesis de las proteínas específicas ocurre

por medio de una serie infinita de enzimas que forman la proteína, luego en otros enzimas que hacen los primeros enzimas y así sucesivamente. Solo se requiere un aparato sintético general, el cual incluye enzimas específicos para la carboxil-activación con el ácido adenílico de cada uno de los aminoácidos. Dada la cinta debidamente codificada y el estímulo para la síntesis, este aparato condensa los aminoácidos apropiados a lo largo de la cinta y luego los desenlaza como una cadena de péptidos de la secuencia aminoácida apropiada para que la proteína sea sintetizada. Cuando la secuencia de las bases se altera en el gen, la secuencia de los aminoácidos en la proteína resulta alterada de modo correspondiente. Usualmente queda afectada la naturaleza y la función de la proteína. Las consecuencias a menudo remotas para el organismo de esta alteración de la estructura y de la función de una molécula proteica la vemos como el carácter hereditario o el cuadro mismo de la enfermedad. Esta opinión es generalmente apoyada por evidencias químicas, pero ha sido ilustrada mucho mejor por los estudios hechos en otra enfermedad hereditaria: la anemia por hematíes falciformes.

Anemia por hematíes falciformes

El término de "enfermedad molecular" fue propuesto por Pauling (1955) cuando en unión de sus asociados demostró que la hemoglobina de los hematíes en esta anemia hemolítica hereditaria era químicamente diferente de la hemoglobina normal, y que todos los síntomas y signo de la enfermedad eran dependientes de esta diferencia molecular. Ingram (1958) identificó esta diferencia haciendo la "dactiloscopia" en un cromatograma de los fragmentos digeridos de la molécula. Un aminoácido particular de los 300 que componen la hemoglobina, uno que

es normalmente ácido glutámico, resulta reemplazado por valina en la hemoglobina de los hematíes falciformes. Ello no altera sin embargo de modo significativo la función transportadora de oxígeno de la hemoglobina, pero dicha función resulta seriamente alterada en un sentido fisiológico más amplio. En su forma desoxigenada, cuando regresa a través del sistema venoso, la hemoglobina alterada es muy insoluble, cristalizando dentro del glóbulo rojo, deformándolo para hacerlo adquirir la forma de hoz, lo que da a la enfermedad su nombre. Estas células no se deslizan suavemente a través de los finos vasos, tendiendo a amontonarse y hemolizarse produciéndose así las trombosis y la anemia características de la enfermedad.

Hallazgos de naturaleza semejante han sido puestos de manifiesto en otras distintas hemoglobinas anormales. Reunidas ellas ilustran claramente la codificación genética ya descrita. La secuencia basal en la cinta DNA descrita por la hemoglobina ha resultado alterada de modo que la valina reemplaza al ácido glutámico en un locus específico. La prueba de esto resulta todavía indirecta. Y es que el portador de solo un gen de células falciformes y un gen normal no ofrece la enfermedad declarada, pero cerca de la mitad de su hemoglobina es de tipo anormal, contenido de valina. Bajo condiciones especiales sus hematíes pueden adquirir la forma de hoz moderadamente (el rasgo de células falciformes), pero ellos casi no ofrecen alteraciones clínicas. Con una dosis doble del gen anormal, casi toda la hemoglobina es del tipo falciforme anormal. Se puede ver cuando se estudian familias que las porciones de la molécula anormal en complemento hemoglobínico producen su segregación del mismo modo que lo hacen los genes en la representación usual del *pedigree*. (Ver Fig. 1).

El cuadro resulta por tanto muy simple: un gen alterado introduce la correspondiente alteración en la secuencia de aminoácidos de la proteína que él produce. Dos genes participan en la síntesis del complemento total de cada proteína, y si ambos genes están alterados, toda la proteína resultará anormal. Queda por demostrar que, al igual que las hemoglobinas, los elementos proteicos de los enzimas inactivos o los sistemas de transporte responsables de las enfermedades hereditarias mencionadas antes, están presentes en las células aunque alterados en algún modo específico que los convierte en no funcionales. En muchos casos, el defecto ha sido localizado al menos en la mitad proteica. Nosotros no podemos predecir los efectos funcionales exactos correspondientes a pequeñas alteraciones en la estructura de las proteínas, pero podemos pensar que algunas de esas alteraciones tengan ligeros efectos mientras otras los produzcan graves. También podemos predecir que pueden existir anomalías hereditarias que afecten a cada uno de los muchos compuestos macromoleculares funcionales formados por patrones genéticos. Es también posible que algunas alteraciones genéticas pueden convertir la codificación en "absurda" y no se formará proteína.

Fenilcetonuria

Esta enfermedad hereditaria que da origen a déficit mental corrientemente, es del mayor interés porque el tratamiento dietético adecuado puede evitar sus graves consecuencias. La enfermedad se describe aquí para enfatizar un tercer aspecto general de las enfermedades hereditarias, el "pedigree de causas" que relaciona las anomalías moleculares hereditarias con las últimas consecuencias que son de significación clínica. Se ha subrayado que las condiciones hereditarias ya mencionadas han sido manifestadas por toda la vida

del sujeto, pero una investigación más precisa revela que solo la alteración molecular primitiva es de por vida, dependiendo las complicaciones que en ellas se originan de factores adicionales. Así, un paciente cistinúrico excreta diariamente grandes cantidades de cistina durante toda su vida, y sin embargo solo unas pocas veces durante su vida se acumularán masas de cistina dentro de su tractus urinario para dar síntomas clínicos. El sujeto alcaptonúrico excreta simplemente cada día una orina que se ennegrece con el reposo. Es cosa ésta tan trivial que muchos pacientes transcurren su vida sin notar la coloración. Y no es hasta la mediana edad que el ennegrecimiento de los cartilagos y el endurecimiento de las articulaciones harán su aparición, dando lugar a lo que puede clasificarse como una enfermedad, es decir algo que interfiere con el bienestar del paciente. Hasta los pacientes de "anemia por hemáties falciformes" presentan crisis injertadas en una vida prácticamente normal. En cada uno de estos ejemplos, un sujeto genotípico y molecularmente anormal se encontraba aparentemente bien, excepto cuando ciertos factores adicionales, actuando de acuerdo con la anomalía básica, producían la enfermedad declarada con sus síntomas y signos. La identificación y el control de estos factores constituye la verdadera meta de la medicina científica y de la terapéutica. La fenilcetonuria es un ejemplo de ambos problemas, el del mecanismo de la enfermedad y el de la terapéutica.

La fenilcetonuria fue descubierta hace más de 25 años, justamente 25 años después de que Garrod publicara su concepto de los errores congénitos del metabolismo. Sería un típico ejemplo de este grupo, y efectivamente fue la primera en que Garrod estableció la relación de *gen-enzima-enfermedad*, demostrándola de modo inequívoco. La

excepción al cuadro usual, que debe ser subrayada aquí, es que el niño que va a tener esta enfermedad es perfectamente normal al nacimiento: mental, bioquímica y molecularmente.

Las manifestaciones uniformes y la precisa identificabilidad de la fenilcetonuria permite definirla brevemente y con precisión inusual. Ambos padres del paciente deben tener la forma defectuosa de uno de los dos genes que controlan la hidroxilasa de fenil alanina. La cantidad de fenil alanina hidroxilasa activa en los padres está lo suficientemente disminuída para ser detectada químicamente, pero no existen serias consecuencias por esta insuficiencia. Como promedio, uno de cada 4 productos de dos padres con esa tara tiene ambos genes defectuosos, tiene la hidroxilasa de fenil alanina completamente inactiva, y tiene fenil cetonuria. Ambos sexos son afectados con igual frecuencia. La incapacidad se manifiesta solo varias semanas después del nacimiento, primero por elevación de la fenil alanina del plasma hasta 30 veces el nivel normal y la excreción de ácido fenil pirúvico. Después de los 6 meses de edad, se nota el retardo del desarrollo mental. Pueden presentarse anomalías neurológicas y convulsiones, pigmentación diluída del pelo y de la piel, así como eczema. En los niños mayores y en los adultos el proceso permanece estacionario. El tiempo de supervivencia está seriamente reducido, al menos tanto como en otras formas de déficit mental. La mayoría de los pacientes son idiotas, unos pocos imbéciles y solo escasos pacientes serán *borderline* en el desarrollo intelectual con respecto a lo normal. La incidencia de esta enfermedad es de cerca de 1 por cada 25,000 habitantes de poblaciones mixtas originarias de países del norte de Europa. La mayoría de los pacientes son confinados en instituciones donde ellos constituyen cerca del 1% de

la población con defectos mentales. Los pacientes son perfectamente diagnosticados por el color verde olivo producido en la orina cuando se agrega Cl_2Fe , lo cual es debido al ácido fenil pirúvico, el metabolito típico de esta enfermedad.

Un hallazgo más sorprendente es que todos los infantes al nacer son iguales a los fenil cetónúricos porque carecen de hidroxilasa de fenil alanina en su hígado. El enzima aparece normalmente por primera vez durante los días o semanas inmediatamente subsiguientes al nacimiento en respuesta a ciertos estímulos de adaptación no identificados. Este cambio es parte de la diferenciación bioquímica normal de los tejidos. Cuando los niños fenil cetónúricos son de este modo estimulados solo se produce aparentemente enzima inactivo. El primer punto a subrayar aquí es que un gen solo no es razón suficiente para la formación de proteína. La información genética y el aparato sintético general para hacer fenilalanina hidroxilasa estaba indudablemente presente en el hígado fetal normal; este sistema, sin embargo, producía proteína solamente cuando se lograban otras ciertas condiciones. He aquí una posible explicación para aquellas enfermedades hereditarias que atacan a ciertas edades aparentemente por vez primera. Es posible que hasta que no se alcance tal edad, el gen defectuoso no sea llamado a entrar en acción.

El próximo punto a subrayar sobre la fenilcetonuria es la naturaleza secundaria del déficit mental. Cuando la fenilalanina hidroxilasa falla en aparecer a su debido tiempo, la fenilalanina dietética en exceso de las necesidades para la formación corporal se acumula en los tejidos y una variedad de metabolitos resulta formada en cantidades anormales. Sin embargo, esta situación no es particularmente perjudicial de por sí. El infante permanece bien du-

rante varios meses, los niños mayores y los adultos tienen esta anomalía por años sin presentar signos de declinación, teniendo las madres que padecen esta condición vástagos normales (necesariamente heterocigóticos). Solo a una edad específica, entre 6 meses y cuatro años y medio, resulta el niño afectado por esta anomalía metabólica. Dicho período crítico es también una época importante para la maduración bioquímica del cerebro, comprendiendo reacciones complejas tales como la mielinización. Se cree que estos procesos pueden ser peculiarmente sensibles a la acumulación de fenil alanina. La sutil alteración de estos procesos críticos en esta época de la vida causa, teóricamente, el déficit mental. Un fuerte apoyo para esta opinión es ofrecido por el número creciente de niños con intelecto normal aunque sean fenil cetónúricos, en los cuales la fenil alanina de la dieta fue terapéuticamente disminuida durante este período crítico.

El tercer punto referente a la fenilcetonuria es que el tratamiento dietético resulta eficaz a pesar de la anomalía genética y molecular del sujeto. Actúa simplemente interrumpiendo la cadena de causas que conduce a la enfermedad. En cierto modo, la enfermedad por fenil cetonuria, es decir el déficit mental, es adquirida, desarrollándose después del nacimiento y pudiendo ser evitada. Solo la anomalía molecular primitiva es heredada y persistente. Excepto durante la fase crítica de la maduración cerebral, es una anomalía relativamente inocua.

Heterocigocidad

El hecho fue subrayado en relación con la sickle cell anemia, en que se observó que el portador heterocigótico de un gen anormal tenía aproximadamente la mitad del componente hemoglobínico del tipo anormal. Ello es también cierto con relación a otras variedades

de hemoglobinas anormales, y es también aparentemente cierto para los efectos proteicos enzimáticos y otros efectos funcionales. El portador de un tipo de cistinuria puede ser descubierto por su capacidad menor que la normal para reabsorber cistina. El portador de un gen de fenil quetonuria posee una cantidad de fenil alanina hidroxilasa menor que la normal como se demuestra por su lenta conversión de fenil alanina en tirosina. Esto da por resultado un nivel basal de fenil alanina en el plasma mayor que el normal, una elevación prolongada e inusualmente alta de la misma en el plasma cuando se da una dosis de prueba de fenil alanina, formándose un bajo nivel de tirosina en las mismas condiciones. Las medidas directas del nivel del enzima en los hematíes de los padres de pacientes con galactosemia indican que ellos tienen también una actividad menor que la normal de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, el enzima que falta en la galactosemia. Recientes resultados, todavía sin publicar, de E. T. Nishimura, demuestran muy claramente el mismo cuadro en las familias reportadas en el Japón que no tienen catalasa en la sangre (acatalasemia). Los heterocigóticos tienen aproximadamente la mitad de la actividad normal, y en cierto número de otras enfermedades hereditarias los heterocigóticos pueden ser a veces identificados por estigmas clínicos ligeros o mínimos semejando la enfermedad homocigótica. Dado que las anomalías moleculares primitivas se identifican perfectamente en estas condiciones y hay tests disponibles para medir las moléculas funcionales más o menos directamente, la lista de anomalías moleculares detectables crecerá dentro de la población aparentemente "normal".

La presencia de moléculas anormales en heterocigóticos de enfermedades hereditarias es importante por varias ra-

zones: como ya se ha discutido, es importante determinar la evidencia para la relación 1 a 1 entre el gen y la proteína; segundo, puede permitir la identificación de aquellos sujetos que pueden tener productos conceptuales afectados por tan seria enfermedad, ya para prevenir su ocurrencia, ya para inducirlos a buscar un método terapéutico precoz para sus niños; finalmente, tales moléculas son una fuente muy grande para explicar las diferencias entre las personas.

Unas pocas consideraciones acerca de la incidencia en la población de genes para enfermedades hasta muy raras, aclararán cómo de este modo cada miembro de la población puede diferenciarse de sus semejantes. El número de portadores heterocigóticos de un gen para una enfermedad rara es asombrosamente alto. Debe serlo hasta para los pocos casos que deberán producirse por matrimonios casuales en dicha población. Una enfermedad homocigótica que ocurra con una frecuencia de 1 por cada 40,000 personas se expresa:

$$2 \sqrt{\frac{1}{40,000}}$$

o sea que una de cada 100 personas debe tener uno de esos genes anormales. Existen prácticamente más de 100 de esas enfermedades, la mayor parte con frecuencia aún mayor que la de 1 en 40,000, y se ha estimado que cada sujeto debe poseer como promedio, media docena de genes simples, cada uno de los cuales cuando se halle en doble dosis podría originar una enfermedad grave. La cuestión está en no dar pábulo a temores sobre la calidad de nuestro material hereditario, pero sí debemos excitar todo esfuerzo tendiente a salvaguardarlo de una subsiguiente deterioración. Es decir que cada individuo con un gen anormal posee también un tipo anormal de moléculas en

su maquinaria metabólica, y que realizará el proceso químico de modo diferente a muchos de sus congéneres. El hecho de que las personas difieren unas de otras es la base de gran parte de la literatura, pero la atribución de estos rasgos diferentes de la personalidad, las idiosincrasias, los requerimientos dietéticos y las susceptibilidades para las enfermedades a la existencia de anomalías de genes simples específicos se halla solo en los comienzos.

Dominancia y recesividad

Casi todo el que tenga aunque sea escasa información o conocimientos de genética intenta acomodar todas las condiciones hereditarias dentro de las categorías de dominante o recesiva, o en grados intermedios determinados por la penetración del gen en cuestión. Debe aclararse por esta discusión que tales categorías son solo descripciones de cómo resultan segregados los caracteres particulares dentro de una familia dada. En términos de moléculas estas palabras no tienen significación alguna. Con un gen anormal, cerca de la mitad del complemento de la proteína en relación con el mismo es anormal. Si la enfermedad es dominante, como sucede en una persona que tenga un gen, o si es recesiva y por lo tanto se manifiesta solo cuando dos de dichos genes se hallan presentes, dependerá enteramente de los factores secundarios descritos en el "pedigree" de las causas. La severidad de la alteración funcional impuesta por el gen simple, la precisión de los métodos usados para establecer el diagnóstico, y la ubicuidad de los factores ambientales que actúan como parte del "pedigree" de causas de los signos clínicos finales, son las cosas que determinan si el patrón de la enfermedad hereditaria en cuestión es dominante o recesivo, y no la rela-

ción gen-molécula. Molecularmente, toda anomalía hereditaria es dominante.

Progresos futuros en las enfermedades hereditarias

Solo en unas pocas enfermedades, aquellas escogidas aquí como ejemplos principales, existe un cuadro muy completo desde el gen hasta los signos clínicos. El propósito del cuadro unificado ofrecido aquí es el de asimilar otras condiciones hereditarias sobre las cuales tenemos pocos datos, para ofrecer un modo de pensar acerca de los mismos y guiar la investigación futura sobre ellos. A modo de resumen, y algo especulativamente, la posible relación de algunas otras condiciones hereditarias pueden ser esquematizadas.

El grupo de anomalías morfológicas hereditarias han sido omitidas dentro del grupo que hemos discutido. No ha sido ello a causa de que la estructura sea heredada de modo diferente que la función, sino simplemente porque nuestros conocimientos sobre la formación de la estructura no puede ser todavía expresada en términos moleculares. Las reacciones moleculares que se producen erráticamente y dan origen a casos de 6 dedos por ejemplo, son las que ocurren durante el desarrollo embriológico. Estas son casi desconocidas para nosotros, al menos en esta contextura. Igual que el niño fenil ketonúrico que se desarrolla normalmente en casi todos los aspectos excepto en cierta etapa de la maduración cerebral, el feto afectado puede sobrevivir con solo una anomalía estructural para registrar los efectos de un desbalance molecular en algún período crítico de su desarrollo.

Existe mucha especulación sobre si algunas enfermedades de incidencia un poco alta son hereditarias, tales como la diabetes, la artritis reumatoidea, la enfermedad de las coronarias y la esquizofrenia. En el cuadro de las en-

fermedades moleculares hereditarias se está estableciendo una perfecta línea divisoria entre la anomalía molecular que es heredada y la enfermedad que se desarrolla sobre ella. La mayoría de las condiciones estudiadas hasta ahora han resultado casi invariablemente en enfermedad. En ellas, el "pedigree" de causas desde la molécula hasta los síntomas clínicos fue directo y poco sujeto a variaciones. Es fácil imaginar otras anomalías moleculares que causarían trastornos solo en situaciones muy particulares. En estas condiciones los factores ambientales serían de importancia capital para la manifestación morbosa. Solo una cierta dieta o una cierta infección, por ejemplo, podría eliminar la enfermedad. Por lo tanto la ocurrencia de la enfermedad no se conformaría exactamente a las expectativas genéticas. Cuando la diferencia molecular primitiva sea identificada, se encontrará que se ha heredado de modo simple.

Otra consecuencia de la disociación de la enfermedad de las alteraciones moleculares primitivas podrá ser aceptada sin denominarlas anormales o defectuosas. Por ejemplo, las distintas sustancias de los grupos sanguíneos son heredadas exactamente en la relación de 1 a 1 entre gen y molécula, no siendo ninguno de ellos necesariamente anormales. Pero en ciertas condiciones, como un feto Rh+ nacido de una madre Rh- o después de una transfusión incompatible, pueden también estas moléculas comúnmente distribuidas causar trastornos.

Existe indudablemente una gran variedad de genes y por tanto de moléculas en la población general, y como pasan sin ser reconocidas en su mayor parte, éstas constituyen las bases sobre las que habrán de desarrollarse las enfermedades, dadas las condiciones apropiadas. Por el contrario, dado un gen anormal, si las condiciones pueden

ser controladas, podrá evitarse la enfermedad. Lo importante es tener presente a este respecto que los genes son susceptibles de que sus consecuencias sean modificadas al igual que otros factores cualesquiera.

Tratamiento

La enfermedad hereditaria es considerada comúnmente como una situación irremediable desde el punto de vista terapéutico, pero ello se desmiente ante la posible modificación de las consecuencias que pueda ocasionar el gen, y así se logra en casos señalados de tratamiento con éxito reportados por distintos autores. Dos tipos principales de terapéutica han sido eficaces: la alteración de la nutrición celular y el reemplazo de la molécula funcional perturbada.

La nutrición celular en un sentido amplio explica el ambiente químico de las células, pudiendo estar constituidas las alteraciones importantes por el acúmulo de un compuesto no metabolizado o un déficit de un compuesto cuya formación se halla bloqueada. La restricción de la galactosa dietética y de la fenil alanina atenuarán de manera efectiva las serias consecuencias de su acumulación en los casos de galactosemia y de fenil ketonuria respectivamente. Existe la esperanza de que la exclusión de los excesos de cobre evitarán la enfermedad de Wilson. El uso suplementario de una sustancia formada en cantidades deficitarias constituye la base de la terapéutica efectiva del síndrome adrenogenital con los corticoides y de ciertos cretinismos familiares con la tiroxina.

La sustitución de la molécula funcional resulta generalmente ineficaz cuando ésta afecta a las proteínas enzimáticas intracelulares. Sin embargo, el sistema de oxidación-reducción que normalmente reduce la metahemoglobina para constituir la forma funcional ha

sido reemplazado por el azul de metileno en cierta forma de metahemoglobinemia. Con dos tratamientos al año estos niños inválidos son restaurados para ejercitar una actividad completa. La inactividad hereditaria de una de las proetinas plasmáticas es tratada casi rutinariamente por sustitución (agammaglobulinemia). Los distintos factores necesarios para la coagulación de la sangre son conocidos principalmente debido a que se hallaron individuos en los cuales faltaban aquéllos, y su tratamiento por transfusión de sangre resulta a menudo un método salvavidas durante una crisis hemorrágica. La sustitución de la insulina en la diabetes es tan bien conocida que resulta a menudo olvidada.

Una tercera y más pródiga vía terapéutica se halla aún inexplorada, y es el control del ambiente del individuo

como un todo y de sus células particulares de tal modo que la debilidad molecular no sea capaz de originar enfermedades. La principal limitación en este caso parece ser nuestra ignorancia sobre los mecanismos de las enfermedades. En solo unos pocos casos son nuestros conocimientos suficientemente adecuados para definir siquiera el problema. El niño que padece de agammaglobulinemia no desarrolla resistencia para las infecciones. Las enfermedades infecciosas son riesgos familiares de modo que no sabemos como habremos de salvaguardar a una de estas personas. Para evitar la diabetes, la enfermedad de las coronarias, la esquizofrenia, y hasta la gota, nosotros debemos aprender mucho más sobre los mecanismos moleculares de la enfermedad que se revelan tan claramente por los errores innatos del metabolismo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Bödeker, C.: "Über das Alkapton", Z. rat. Med. 7, 130-145 (1859).
- 2.—Garrod, A. E.: "A Contribution to the Study of Alcaptonuria", Med.-Chir. Trans. 82, 357 (1899).
- 3.—Garrod, A. E., "The Incidence of Alcaptonuria: A Study in Chemical Individuality", Lancet II, 1616-1620 (1902).
- 4a. Garrod, A. E. "Inborn Errors of Metabolism" 1st ed., London, Frowde, Hodder & Stoughton, (1909).
- 4b.—Garrod, A. E. "Inborn Errors of Metabolism" 2nd ed., London, Oxford University Press, (1923).
- 5.—Glass, B., "Symposium on Atherosclerosis", Nat. Academy Science, Nat. Res. Council, Washington, D. C., Publ. 338, (1955), p. 63.
- 6.—Hiatt, H. H., "Metabolism of D-Gluconolactone in Normal and Pentosuric Human Subjects", Biochem. Biophys. Acta 23, 645-47 (1958).
- 7.—Ingram, V. M., Scientific American 198, 68 (1958).
- 8.—Kenney, F. T., Reem, G. H. and Kretschmer, N., Science 127, 86 (1958).
- 9.—Kirkman, H. N., and Bynum, E. "Enzymatic Evidence of a Galactosemic Trait in Parents of Galactosemic Children", Ann. Human Genetics 23, 117-126 (1959).
- 10.—Knox, W. E., "Sir Archibald Garrod's Inborn Errors of Metabolism" Am. J. Human Genetics 10:
 - a. I. Cystinuria, pp. 3-32.
 - b. II. Alcaptonuria, pp. 95-124.
 - c. III. Albinism, pp. 249-267.
 - d. IV. Pentosuria, pp. 385-397.
- 11.—Knox, W. E., and Hsia, D. Y., "Pathogenetic Problems in Phenylketonuria", Am. J. Med. 22, 687-702 (1957).
- 12.—La Du, B. N., Zannoni, V. C., Laster, and Seegmuller, L. U. "The Nature of the Defect in Tyrosine Metabolism in Alcaptonuria", J. Biol. Chem. 230, 251-260 (1958).
- 13.—Pauling, L., "The Harvey Lectures", (1955), XLIX, p. 216-241.
- 14.—Pieter, H., "Une famille d'alcaptonuriques", La Presse Med. 33, 1310 (1925).
- 15.—Sillers, W. K., Am. J. Anat. 100, 225-240 (1957).
- 16.—Sillers, W. K., Anat. Rec. 130, 135-144 (1958).
- 17.—Thannhauser, S. J., "Stoffwechsel und Stoffwechselkrankheiten", Munich, J. F. Bergmann, (1929), p. 216.
- 18.—Touster, O., and Harwell, S. O., "The Isolation of L-arabitol from Pentosuric Urine", J. Biol. Chem. 215, 677-684 (1958).