

Enfermedad molecular y evolución

Por el DR. LINUS PAULING^(*)

El universo se halla constituido por materia y energía radiante. El cuerpo humano está formado por moléculas—moléculas de todas clases; pequeñas moléculas tales como la molécula de agua, que consta de solo 3 átomos— una molécula muy importante que se halla presente en mayor número que ninguna otra en el cuerpo humano; moléculas mayores, de tamaño mediano, tales como las que constituyen las vitaminas; y algunas moléculas muy grandes, moléculas proteicas, moléculas polisacáridas, moléculas de ácido nucleico.

Creo que es posible que el ser humano manufacture de 50,000 a 100,000 diferentes clases de moléculas proteicas. Una molécula proteica representativa, tal como la hemoglobina, consta de 10,000 átomos. Tiene una estructura bien definida; para la mayoría de las moléculas proteicas no sobra ni un solo átomo.

Las moléculas proteicas de distintas clases son manufacturadas por genes, que son asimismo moléculas de ácido deoxyribonucleico. Cada uno de nosotros hereda la mitad de su complemento de genes, aproximadamente 50 mil, de su padre y la otra mitad, aproximadamente 50,000 de su madre. Son estas moléculas, 100,000 moléculas de

DNA, que hacen que el ser humano sea lo que es, y que le confieren sus características.

Estas son las moléculas más importantes en el mundo. Este "pool" de plasma germinal humano constituye una preciosa herencia de la raza humana.

Hace pocos años se descubrió que algunas enfermedades eran enfermedades moleculares, enfermedades de las moléculas proteicas. Un gen, una molécula de ácido deoxyribonucleico, puede ser dañada por radiación cósmica o algún otro agente mutagénico de tal modo que algunos átomos de aquél quedan fuera de lugar. Este gen se duplica entonces en su nueva forma de mutación. Además, cuando dicho ácido realiza su otra función, que no es la de autoduplicación, determinará la naturaleza de una molécula de proteína, que tiene la responsabilidad de manufacturar. Un gen mutado produce una molécula de proteína alterada, que consta de algunos átomos distintos a los correspondientes a la molécula de proteína normal.

La enfermedad molecular está estrechamente relacionada con la evolución. La aparición del concepto del Bien y del Mal, que fue interpretado por el hombre como su expulsión dolorosa del Paraíso fue probablemente una enfermedad molecular que resultó ser Evolución.

Entre las enfermedades moleculares hay muchas que envuelven enzimas. Por

^(*) Prof. de Química, (Institute of Chemistry, California. Institute of Technology, Pasadena California). Publicado en The Bulletin of The New York Academy of Medicine, vol. 49, Mayo de 1964. Traducido al español por el Dr. E. Alemán con permiso del Bulletin of the N. Y. Academy of Med.

ejemplo, la fenilketonuria, que es responsable del 1% de los sujetos institucionalizados como mentalmente defectuosos en los E. U., es una simple enfermedad molecular, razonablemente bien conocida. Una persona de cada ocho tiene un gen anormal que se conoce como el gen de la fenilketonuria. Una persona normal tiene dos genes que manufacturan, independientemente uno del otro, un enzima en el hígado que cataliza la oxidación de la fenilalanina en tirosina. Este es un mecanismo para convertir parte de la fenilalanina de nuestros alimentos, presente en exceso de nuestras necesidades, en otro aminoácido, tirosina, que es utilizado entonces de varios modos en el cuerpo humano. Una persona de cada 80 tiene un gen normal que manufactura este enzima, y un gen anormal (el gen de la fenilketonuria) que no manufactura el enzima o que manufactura una molécula de enzima anormal, que carece de la actividad enzimática.

Estas personas, portadoras de un solo gen de la fenilketonuria, manufacturan sólo el 50% del enzima que los sujetos normales; pero este 50% es suficiente para disponer de la fenilalanina que ellos ingieren. Son denominados fenilketonúricos heterocigóticos. No resultan dañados significativamente por el hecho de ser portadores del gen en una sola dosis.

Sin embargo, cuando dos de estos heterocigóticos contraen matrimonio se puede decir que se sacan la lotería, la mayor de las loterías del mundo, en que el niño por venir, el huevo fertilizado, realiza la selección de uno u otro de los dos miembros del par de genes que aporta el padre y uno u otro de los dos miembros del par de genes que aporta la madre. En el promedio, la cuarta parte de los niños heredan el gen defectuoso del padre y también el

gen defectuoso de la madre. Poseen por tanto el gen defectuoso en doble dosis y no elaboran ninguno de los enzimas que catalizan la oxidación de la fenilalanina en tirosina. Cuando ese sujeto homocigótico como sus alimentos, conteniendo proteína ordinaria, la fenilalanina se forma en su corriente sanguínea y el líquido céfalo-raquídeo en concentraciones tan grandes como de 50 veces la de los individuos normales. Esta alta concentración de fenilalanina y de otras sustancias originadas de ella interfieren con el crecimiento y la función del cerebro de tal modo que lo convierten en un defectuoso mental, quizás con un I. Q. tan bajo como de 20. Además, los genes de la fenilketonuria en doble dosis hacen que padezca de eczema y otros problemas somáticos.

Se ha reconocido en los recientes años que es posible tratar esta enfermedad, fenilketonuria. El diagnóstico de la misma se puede hacer a edad tan temprana como de un mes de nacido el niño, debiendo alimentarse el bebé con una dieta de hidrolizado de proteína del cual se ha separado la mayor parte de la fenilalanina. Los niños tratados de este modo parecen desarrollarse de forma esencialmente normal.

Otras enfermedades moleculares que se han originado durante el curso de la evolución se han controlado de modo algo semejante. Los seres humanos requieren muchas vitaminas. La pelagra es un ejemplo de enfermedad por déficit de vitaminas, una enfermedad molecular que se originó a través de una mutación, hace quizás millones de años, y fue curada entonces por el proceso heterotrópico de comer otros organismos que elaboran dicha vitamina. El escorbuto y otras avitaminosis son también enfermedades de esta clase. No se acostumbra admitir que padecemos estas enfermedades, porque las tratamos

como cuestión de hábito al ingerir lo que se llama una dieta apropiada o balanceada.

Organismos tales como el hongo del pan rojo son capaces de elaborar no sólo todas las vitaminas, sino también todos los aminoácidos. En algún momento de nuestra historia evolucionaria sufrimos mutaciones que dieron por resultado la pérdida de nuestra capacidad para elaborar los distintos enzimas envueltos en esta síntesis. Cada una de estas mutaciones produjo en nuestros predecesores una enfermedad, una enfermedad para cada vitamina de las que nosotros requerimos, y una enfermedad para cada uno de los nueve aminoácidos esenciales para el hombre. La mayoría de nosotros mantienen estas enfermedades bajo control al ingerir la alimentación adecuada.

Yo he estado interesado especialmente en las hemoglobinopatías, que son las enfermedades, incluyendo la anemia por sickle-cell, a las cuales se aplicó el nombre de enfermedad molecular por primera vez. Yo recuerdo muy bien el tiempo, hace unos quince años, en que tres de mis alumnos: Dr. Harvey Itano, Dr. S. J. Singer y Dr. I. C. Wells, realizaron el experimento crucial que demostró que la sickle-cell anemia era una enfermedad de la molécula de hemoglobina. Yo hice esta predicción 3 años antes, y el Dr. Itano trabajó durante esos tres años hasta cumplir el objetivo en unión de los Dres. Singer y Wells.

Los pacientes con sickle-cell anemia son anémicos debido a que sus hematías tienden a torcer su forma. Estas células deformadas son reconocidas entonces por el bazo como anormales, siendo destruidas tan rápidamente como para hacer imposible que el paciente pueda elaborar nuevos hematías con la suficiente rapidez a fin de evitar que se

produzca la anemia. Además, las células deformadas son pegajosas; se adhieren unas a otras y obstruyen los capilares de tal modo que interfieren con el flujo de la sangre, causando así el daño de diferentes órganos por la consiguiente anoxia. Esta enfermedad, que envuelve una deformación de los hematías, parece ser una enfermedad clásica de las células, tal como las describió Rudolf Virchow. Sin embargo, el hecho de que las células adquieran la forma de hoz sólo en la circulación venosa y recobren su forma normal en la circulación arterial me pareció, en 1945, suministrar una fuerte indicación sobre que la enfermedad sea en efecto un proceso de la molécula de hemoglobina, que está presente como hemoglobina en la sangre venosa y como una molécula diferente, oxihemoglobina, en la sangre arterial.

Todos sabemos que las moléculas de proteína tienden a ser pegajosas. Si una solución de moléculas de proteína, elaborada por algún organismo vivo y seleccionada por el proceso evolucionario de prueba y error para no seguir siendo pegajosa, pero permaneciendo en solución en lugar de formar un coágulo insoluble, es alterada un poquito por el calentamiento, aún a una temperatura de no más de 60°C., de modo que las moléculas se vuelvan ligeramente desdobladas (denaturalizadas), entonces la propiedad característica de ser pegajosa se hace en sí evidente; las moléculas de proteínas denaturalizadas se adhieren unas a otras, para formar un coágulo insoluble de proteína denaturalizada. No debe sorprendernos que, aunque las moléculas de hemoglobina normal, seleccionadas por el proceso evolucionario, son capaces de permanecer separadas unas de otras aún en la solución concentrada (30% de proteína) que está dentro de la célula roja, un cambio de estructura resultante de una mutación

de genes puede originar que la molécula de hemoglobina alterada tenga una región pegajosa en su superficie, suficiente para hacerla tender a adherirse a otra, que se adheriría a una tercera, a una cuarta y así sucesivamente, para formar un largo bastón de estas moléculas. Estos bastones se alinearían entonces parejamente, atraídos por las fuerzas de atracción de Van de Waals, para formar una especie de cristal en forma de aguja que crecerá más y más hasta que, cuando se haga más largo que el diámetro del hematíe, torcerá la forma del mismo al alterar la forma de la membrana de la célula, volviéndola pegajosa, haciendo que los hematíes se enreden unos con otros para producir de ese modo las manifestaciones de la enfermedad. En consecuencia tenemos una explicación molecular de las manifestaciones de la enfermedad, basada en la hipótesis de que es una enfermedad de la molécula de hemoglobina, una enfermedad molecular en que la molécula anormal es manufacturada por un gen mutado. Podemos comprender además que en las moléculas de oxihemoglobina, o sea moléculas de hemoglobina a las cuales están adheridas moléculas de oxígeno, estas últimas pueden interferir por obstáculo especial, con las fuerzas de atracción de Van der Waals y de ese modo impedir el sickling de los hematíes en la circulación arterial.

La incidencia del gen de la fenilketonuria es lo suficientemente pequeña para permitir que se pueda explicar como resultado de un estado estable determinado por la ratio en que se producen nuevos genes de la fenilketonuria por mutación y la ratio en que los genes de la fenilketonuria son retirados del *pool* de plasma germinal humano por la muerte sin progeñe de los homocigóticos de fenilketonuria. Pero la incidencia del gen de hemoglobina sickle-cell sea demasiado grande para ser ex-

plicado de este modo. Se reconoció que el gen sickle-cell debe conllevar un carácter ventajoso, para compensar la desventaja de la muerte de los sickle-cell homocigóticos sin progeñe. La sugerencia fue hecha por el Dr. Russell Brain de que los heterocigóticos que son portadores de un gen sickle-cell están protegidos contra la malaria, él había observado que existe una mayor incidencia de falciformación en las aldeas africanas donde la malaria no es endémica. El Dr. Anthony Allison, de Oxford, realizó luego un experimento que ofreció buena evidencia de que los sickle-cells heterocigóticos estaban protegidos contra la malaria subterciaria maligna (*Plasmodium falciparum*). En consecuencia podemos comprender por qué el gen sickle-cell se extiende en la población de Africa. Un heterocigótico que sea portador de un gen sickle-cell recién formado por mutación, fue protegido contra la malaria. La mitad de sus hijos heredó el gen sickle-cell, y, debido a estar protegidos contra la malaria, contribuyeron rápidamente a la diseminación del gen en la población. Finalmente, la incidencia del gen se aproximó al valor de estado estable. En los matrimonios entre heterocigóticos que formarán una gran fracción de la población, una cuarta parte de los niños heredarán dos genes normales para hemoglobina y morirán, en gran parte, de malaria; una cuarta parte heredará dos genes sickle-cell y morirán de sickle-cell anemia; pero una mitad serán heterocigóticos, igual que sus padres, y estarán protegidos contra la malaria y presentarán la enfermedad por sickle-cell anemia. Este proceso da un rendimiento de sólo un 50% en niños, pero sólo recientemente se ha creído que este rendimiento sea satisfactorio.

El próximo paso en el proceso deberá ser una mutación que elabore un tipo de hemoglobina tal que en estado homo-

zigótico dé protección contra la malaria y no produzca una enfermedad tal como la sickle-cell anemia. Este gen de nueva mutación puede diseminarse rápidamente por la población, dado que los dobles heterocigotes, en el nuevo gen y en el gen sickle-cell, estuvieran protegidos también contra la malaria y no tuvieran ninguna enfermedad grave. No parece improbable que otra forma conocida de hemoglobina anormal, la hemoglobina C, represente un paso en esa dirección.

Desde el descubrimiento de la hemoglobina sickle-cell hace 14 años, varias docenas de otras hemoglobinas humanas anormales han sido descubiertas. Estas hemoglobinas anormales están asociadas con varias enfermedades distintas.

La naturaleza de la diferencia entre la hemoglobina de la sickle-cell (hemoglobina S) y la hemoglobina humana de adulto normal (hemoglobina A) ha sido descubierta ahora, principalmente a través de los esfuerzos de Vernon M. Ingram y sus colaboradores. Inmediatamente después del descubrimiento de la hemoglobina S, el Dr. Walter A. Schroeder y asociados del California Institute of Technology practicaron un análisis de los aminoácidos de la hemoglobina S y de la hemoglobina A, y pudieron reportar que la composición en aminoácidos de las dos hemoglobinas es estrechamente similar, con ningún aminoácido representado por una diferencia de más de dos residuos. Ingram desarrolló entonces un nuevo y poderoso método para investigar la estructura de las moléculas de hemoglobina, que él denominó el método de la "huella digital" —denominado también método de patrón-péptido. La muestra de hemoglobina se fracciona en péptidos por la acción proteolítica de un enzima, tal como la tripsina. Unos 26 péptidos, conteniendo un promedio de unos 12 resi-

duos aminoácidos cada uno, resultan en la mezcla obtenida de este modo. La mezcla se separa luego en sus péptidos constituyentes por un proceso bidimensional realizado en una hoja de papel de filtro. La separación por movilidad en un campo eléctrico se realiza a lo largo del eje horizontal de la hoja de papel de filtro, y luego se separa por el método cromatográfico, que usa un solvente fluente en la dirección vertical. De este modo Ingram pudo demostrar que la hemoglobina S difiere de la hemoglobina A sólo por la sustitución de un simple residuo aminoácido en una mitad de la molécula de hemoglobina por el residuo de otro aminoácido.

Schroeder y asociados, en Pasadena, hallaron que las moléculas de hemoglobina consisten usualmente de 4 cadenas de polipéptidos, dos de una clase y dos de otra. La molécula de hemoglobina humana de adulto normal contiene dos cadenas alfa, que tienen la secuencia val-leu-ser-pro-ala... (total 141 residuos), medidas a partir del aminoácido libre terminal y dos cadenas beta, que tienen la secuencia val-his-leu-thr-pro-glu... (total 146 residuos). Ingram y Schroeder hallaron que las cadenas alfa de hemoglobina S son las mismas que las de la hemoglobina A, pero que las cadenas beta son diferentes: la cadena beta de la hemoglobina S contiene valina en la sexta posición, en lugar de glutamato; los otros 145 residuos son los mismos.

La secuencia de aminoácidos ha sido determinada para varias otras hemoglobinas anormales. Para cada una de las estudiadas hasta ahora, la mutación afecta sólo a un residuo aminoácido. Así, para la hemoglobina C existe lisina en el sexto residuo de la cadena beta, en lugar del glutamato de la hemoglobina A o la valina de la hemoglobina S. Para la hemoglobina E existe lisina en la posición 26, en lugar de glutamato.

Otras hemoglobinas anormales comprenden una anomalía en la cadena alfa en vez de la cadena beta. Un interesante ejemplo es la hemoglobina M Boston. En la cadena alfa de la hemoglobina adulta normal el residuo 58 es histidina. Este residuo histidina se sabe que está cercano al átomo de hierro del grupo heme. La histidina lleva usualmente una carga positiva debido a la unión de un proton al anillo imidazol. En la hemoglobina M Boston la cadena alfa tiene tirosina en la posición 58, en lugar de histidina. Debido a que el residuo tirosina no lleva una carga positiva, podemos esperar que sea más fácil para el átomo hierro del grupo heme asumir una carga positiva extra, conducente a un grupo ferriheme, que contiene un hierro tripositivo, en lugar del ferroheme normal, que contiene hierro bipoisitivo. La presencia de hemoglobina con hierro tripositivo la convierte en ferrihemoglobina (llamada también metahemoglobina); y los portadores del gen para hemoglobina M Boston tienen en efecto una enfermedad, una forma de metahemoglobinemia.

En esta enfermedad, como en la sickle-cell anemia, la diferencia en la secuencia de los aminoácidos de la hemoglobina anormal suministra una explicación razonable para las manifestaciones de la enfermedad producida por la anomalía molecular.

Varias conclusiones interesantes sobre el proceso de evolución han sido alcanzadas en base de la comparación de la secuencia de aminoácidos de las moléculas de hemoglobina de diferentes especies animales, realizadas especialmente por mi colaborador Dr. Emile Zuckerkandl. Se ha encontrado que el patrón péptido de las hemoglobinas de animales de distintas especies se pueden correlacionar razonablemente bien con las ideas generalmente aceptadas sobre las relaciones evolucionarias entre las es-

pecies. Por ejemplo, los patrones péptidos de la hemoglobina del gorila y de la del chimpancé son casi idénticas a las de la hemoglobina humana. El patrón péptido de la hemoglobina del mono Rhesus es algo distinta del de la hemoglobina humana. Diferencias aún mayores con respecto a la hemoglobina humana se encuentran en los patrones de la hemoglobina de la vaca, de la del caballo, de la del cerdo, y las hemoglobinas de otros mamíferos. Las diferencias son mayores aún en las hemoglobinas de los peces y los gusanos.

Un estudio detallado de la hemoglobina de los caballos ha demostrado que las cadenas alfa difieren de las de la hemoglobina humana por cerca de 18 sustituciones de aminoácidos, como pasa también con las cadenas beta de las dos hemoglobinas. Si aceptamos 130 millones de años como el tiempo que ha transcurrido desde que se separaron las líneas evolucionarias del caballo y del hombre, como lo estiman los paleontólogos, llegamos a la conclusión de que cada cadena ha sufrido como promedio una mutación evolucionaria efectiva cada 14.5 millones de años. Podemos usar entonces este valor para discutir otras épocas evolucionarias.

La cadena alfa del gorila y la cadena alfa humana difieren en dos residuos, y la cadena beta del gorila y la cadena beta humana difieren en una; el promedio, 1.5, indica que han transcurrido cerca de 11 millones de años desde la derivación de estas cadenas de su cadena común ancestral es decir, que las líneas evolucionarias que conducen a los gorilas actuales y los seres humanos actuales se separaron una de otra hace unos 11 millones de años. Los estimados hechos por los paleontólogos para esta época oscila entre 10 y 35 millones de años.

Otra cuestión interesante es la de las diferencias bioquímicas entre los seres

humanos adultos y los fetos humanos. El feto humano elabora un tipo especial de hemoglobina, denominado hemoglobina F. En la hemoglobina F las cadenas beta son anormales. Estas cadenas beta anormales, que son denominadas cadenas gamma, difieren de la beta humana adulta en 36 de los 146 residuos aminoácidos. En consecuencia calculamos, asumiendo que haya existido una tasa constante de mutación evolucionaria efectiva, que las cadenas gamma y las cadenas beta se separaron una de otra hace unos 260 millones de años, es decir, al comienzo del período carbonífero.

Esta época ocurrió, en efecto, mucho antes de que los seres humanos vinieran a existir. Otros mamíferos tienen también hemoglobinas fetales que difieren de las del adulto en sus especies y podemos llegar a la conclusión de que las formas fetales de diferentes mamíferos se separaron de los formas adultas hace unos 260 millones de años, y en

cierto sentido constituyen un grupo de especies diferentes del grupo adulto. Con respecto a la hemoglobina, un feto humano se parece al caballo fetal más estrechamente que un adulto humano.

Creo que será posible, mediante la determinación detallada de las secuencias de aminoácidos de las moléculas de hemoglobina y de otras moléculas obtener mucha información sobre el curso del proceso evolucionario, e iluminar la cuestión del origen de las especies.

Además, creo que el estudio ininterrumpido de la estructura molecular del cuerpo humano y la naturaleza de la enfermedad molecular suministrará información que contribuya al control de las enfermedades y disminuya significativamente la cantidad de sufrimiento humano. La biología molecular y la medicina molecular son nuevos campos de la ciencia que pueden desarrollarse ampliamente en beneficio de la humanidad.