Excmo. Sr. Director.
Excmos. Sres. Académicos.
Sras., Sres.:

En una de mis últimas conferencias, que versaba sobre bioquímica perinatal, y en la que había insistido sobre la importancia de los conocimientos ya adquiridos y de su aplicación con el fin de evitar lesiones cerebrales irreversibles, terminaba diciendo que «el nacimiento merece al menos tanta atención —clínica, analítica, etcétera— como la muerte». Esta conclusión, tan lógica como difícil en la práctica, implica muchos convencimientos, algunos de los cuales, muy significados, caen fuera del ámbito científico. Con perfiles menos precisos y seguramente con otros matices, los mismos convencimientos tenía y me alentaban cuando hace ya dieciocho años recibía en aquellos inolvidables locales de la calle Campoamor el premio de esta Real Corporación y el título de Académico correspondiente. Llegaba entonces de la misma mano que me trae ahora, la de mi maestro el Prof. Santos Ruiz. Permitidme que hoy, en esta ocasión tan solemne para mí, utilice el posesivo, porque ya sé que Santos Ruiz es maestro de todos los bioquímicos españoles. Directa o indirectamente, la raíz de todos los departamentos de Bioquímica que hoy proliferan en las facultades de Farmacia, de Química, de Biológicas, de Medicina, de Veterinaria..., tienen su raíz en la intuición y en el esfuerzo de este hombre inteligente, tenaz, discreto y bueno que en 1941 introdujo a la Bioquímica, como tal disciplina diferenciada, en los planes de estudio de la carrera de Farmacia.

Comprendereis que debía empezar este discurso rindiendo público homenaje a quien ocupando indudablemente la posición de mayor relieve ha visto complacido —¡que cosa tan extraordinaria!— el alto vuelo y el luciente brillo de quienes, por razones de edad, circunstancias menos adversas y esfuerzo personal constituían la sazón, el

fruto maduro, aun sin saberlo, de la ubérrima siembra del Prof. Santos Ruiz. Es normal que, para quienes empiezan, el pasado sea lo que queda oculto tras el primer recodo del camino. Pero también a ellos les enriquecerá la lección de su vida, D. Angel, cuando, algún día, vayan aguas arriba hacia la fuente. Esta lección que deseo fervientemente que nos siga dando el Prof. Santos Ruiz durante muchos años.

Cuando todavía no sabía que iba a darme la más importante enseñanza, la de su ejemplo, asistí a su clase —mi primera clase de Bioquímica— en el mes de octubre de 1954. Allí surgió mi vocación, que otras actividades y servicios a mi país, en cuyo desempeño he puesto toda la voluntad que merecía el alto honor de haberme sido encomendados, no han logrado aminorar. Bien al contrario, cada día siento con mayor intensidad, y así procuro expresarlo, que la búsqueda, difusión y aplicación de los conocimientos es la tarea más hermosa que se ofrece a la terrible perplejidad del hombre, a su asombro, a su duda y a su miedo. Recuerdo que, a los pocos meses de terminar la Licenciatura de Farmacia, cuando empezaba a trabajar en el Laboratorio del Prof. Santos Ruiz, visité una institución de minusválidos psíquicos. Aquel día se afianzaron muchas cosas en mi vida, otras se borraron por la fuerza de aquel recuerdo y se hizo más intenso y urgente el sentimiento de que es preciso contribuir a aliviar, a hacer más llevadera la vida del hombre, único ser consciente del gran don de la vida. Y de la muerte.

Vengo a ocupar, con un retraso de más de dos años justificado por vuestra indulgente comprensión en tanto ocupaba el cargo de Subsecretario de Educación y Ciencia, la vacante que dejara el Excelentísimo Sr. D. Nicolás Gutiérrez del Alamo y García. Constituye para mí una grata obligación ofreceros, brevemente, una glosa de su vida. D. Nicolás Gutiérrez del Alamo nació en León el día 3 de noviembre de 1886. Cursó sus estudios de Farmacia en la Facultad de Granada, obteniendo en 1910 el premio extraordinario en la licenciatura. En 1924 obtiene, por concurso, el empleo de capitán en el Instituto de Higiene Militar. Con igual empleo, en 1927, es destinado por concurso al laboratorio central de Farmacia Militar, obteniendo en 1935, ya con el grado de comandante, la jefatura de sección VI del Laboratorio de Farmacia Militar. En 1940 es jefe de los ser-

vicios del Ejército de Marruecos en el empleo de teniente coronel, siendo designado en 1948 jefe de Farmacia del primer cuerpo del Ejército y de los servicios de Farmacia de la primera región.

Comparte su dedicación a la Farmacia Militar con la aplicación de los conocimientos adquiridos, como lo demuestra el nombramiento que en 1935 le hace la Presidencia del Gobierno designándole Miembro de la Comisión que había de redactar las normas sobre el cultivo del cacao. El mismo, al comentar sus actividades farmacéuticas durante su estancia en Africa, en calidad de jefe de los servicios farmacéuticos, indicó su dedicación al fomento del cultivo de plantas medicinales, actividades que refiere el farmacéutico D. José Losana Méndez en su obra «Contribución de los farmacéuticos militares a la labor de España en el Norte de Africa», publicada en 1958 por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, cuando dice «que fue el catalizador de la explotación del ricino en el Norte de Marruecos». Fue asesor farmacéutico, en la Presidencia del Gobierno, de la Dirección General de Plazas y Provincias Africanas, pasando ulteriormente, desde 1944, al Ministerio del Ejército con la misión de coordinar y unificar las fabricaciones y elaboraciones de los cinco laboratorios de Farmacia Militar.

Fue también colegiado de honor de los Colegios de Segovia y Cádiz y Tesorero de esta Real Corporación, cuya Sección VII presidió. Le fue concedida la Medalla de Alfonso XIII y la Cruz y Placa de la Real Militar Orden de San Hermenegildo.

Su vida se dedicó enteramente a la Farmacia y, en sus últimos doce años, prestó inmejorables servicios a esta Real Corporación. Sé que estos datos son breve y pálido reflejo de la trayectoria científica, profesional y humana de mi antecesor, a quien dedico el más respetuoso recuerdo en el momento en que —por este discurrir ineludible al que antes hacía referencia— voy a sucederle.

¿En virtud de qué merecimientos? No me corresponde a mí juzgarlos. Sí me corresponde, en cambio, expresaros mi profunda gratitud por la satisfacción que me habeis dado. Pero, sobre todo, por la alegría que proporcionais a mis padres, a mi mujer, a mis hijos, a los míos. A mis colaboradores, a mis amigos, a todos los que se sienten distinguidos con esta distinción, porque han compartido conmigo tantos esfuerzos, tantas horas de trabajo, de ilusión, de despa-

cho, de laboratorio. No debo hacer expresa mención de quienes han trabajado conmigo o trabajan ahora en el Departamento de Bioquímica, de todos aquellos a quienes he ofrecido y sigo ofreciendo mi impulso, mi apasionada dedicación a la investigación y a la docencia. No sé —porque de estas cosas no se hacen cuentas— qué me deberán ellos a mí. Pero sí puedo deciros cuánto les debo yo a ellos, a su fértil capacidad inquisitiva, a su confianza, a su respeto. No voy pues a nombrarlos, con una excepción: la de Alfonso Cano, seguramente el más brillante, el más dotado, que murió súbitamente —increiblemente, como se muere a los veintiséis años— cuando tan ocupado se hallaba con la vida. Por ello, os explicareis esta excepción, esta conmovida evocación que tanto tiene de plegaria.

* * *

Si la salud, es decir, el estado normal de una célula o de un organismo puede definirse como el resultado del proceder correcto y armónico de las múltiples reacciones que la integran, una situación patológica consistirá en la desviación de esta situación metabólica de tal modo que, al imprimirle o restarle ritmo a su habitual actividad, conduce a una enfermedad, cuando la situación es transitoria y se restablece el equilibrio, o a la muerte, cuando se alcanza una alteración de tal grado que ya no es reversible. La sintomatología consiste, en esencia, en una formidable ampliación de sutiles modificaciones a nivel molecular. Las bases moleculares de la patología constituyen hoy uno de los campos más apasionantes y atractivos de la investigación bioquímica y permiten explicar la raíz, la etiología de múltiples afecciones clínicas, el fundamento de muchos tratamientos terapéuticos y de muchos datos utilizados en el diagnóstico. Pero no sólo permiten interpretar fenómenos fisiológicos y alteraciones de los mismos ya conocidas, o poner de manifiesto el mecanismo íntimo de acción de los medicamentos que ya se venían aplicando, sino que —y esto es lo más importante— han permitido progresar en el conocimiento de la patología no partiendo de la dilucidación de lo empírico sino del discernimiento y desarrollo de lo racional, estableciendo premisas de gran trascendencia en las ciencias biomédicas.

No he querido establecer precisiones al título, aparentemente muy genérico, de «Patología molecular» que he dado a este discurso. No voy, desde luego, a revisar panorámicamente las múltiples facetas y extensas áreas de conocimiento que el enunciado incluye. Existen revisiones, algunas muy recientes (1), que cumplen con gran detalle este propósito, ofreciendo una visión de conjunto con capítulos tan expresivos como los siguientes: control de la expresión genética en las células animales, polimorfismo genético, patología molecular de diversas proteínas y enzimas, hemoglobinopatías y enzimopatías relacionadas con el metabolismo de los prótidos, glúcidos, lípidos y ácidos nucleicos, sistemas de detección, variantes genéticas,

bases actuales y futuras de la terapéutica... Limitaremos, pues, nuestro recorrido, porque sólo me creo autorizado a mostraros los tramos que mejor conozco o que más me gustan, convencido de que la consideración detallada de unas parcelas aporta criterios firmes y extrapolables para emprender bien sea el estudio de otra faceta o la reflexión sobre el conjunto.

En la actualidad el concepto de «patología molecular» se aplica a todas aquellas anormalidades bioquímicas hereditarias que conducen a una alteración metabólica. Una leve modificación en la información genética se traduce en una proteína inhábil para catalizar una reacción determinada. Todo el amplísimo conjunto de factores epigenéticos de los que depende el adecuado funcionamiento de una reacción enzimática, así como los sutiles sistemas de su regulación inmediata, no se incluyen en esta definición, aun cuando constituyen, ciertamente, la base conceptual para una interpretación a nivel molecular de las más diversas situaciones patológicas. ¿Es que acaso la diabetes y otras múltiples endocrinopatías no son, en realidad, capítulos de la patología molecular? Y lo mismo sucede con las alteraciones de las inmunoglobulinas, miopatías, cirrosis, etc. Sin embargo, vale la pena insistir en ello, no se incluyen como capítulos de la patología molecular si no tienen una causa hereditaria bien establecida, es decir, la «Patología molecular» se circunscribe a las proteinopatías o alteraciones moleculares de las proteínas (tengan actividad enzimática reconocida o no) que se originan como consecuencia de una alteración genética. La extensión del concepto a las situaciones patológicas no hereditarias equivaldría, prácticamente, a contraponer la Patología molecular a la Biología molecular. En una alteración metabólica no hereditaria puede restablecerse el equilibrio, transitoriamente desplazado, de una reacción dada mediante el tratamiento que conduzca nuevamente a las condiciones normales, porque la enzima se halla presente y/o su biosíntesis, estimulada o reprimida a través de los mecanismos más sofisticados de regulación, conduce a una proteína activa, lo que refleja la inexistencia de alteraciones a nivel genético. En cambio, en las enfermedades genéticas, la proteína enzimática no tiene la estructura primaria y, por tanto, la disposición espacial que le permita cumplir eficazmente su quehacer biológico.

PATOLOGÍA A NIVEL MOLECULAR

Actualmente, el progreso del conocimiento sobre la naturaleza y control de los procesos metabólicos ha alcanzado tal grado que es posible establecer, según Brady (2), que todas las enfermedades son consecuencia de una anormalidad metabólica primaria o una alteración metabólica producida por algún agente externo.

Todas las funciones del organismo pueden ser definidas en términos de cuatro variables específicas. *La herencia genética* determina la naturaleza de los elementos estructurales y funcionales que las células producen. La capacidad del organismo para hacer frente a sus necesidades y al ambiente que le rodea depende de las proteínas —tanto enzimáticas como estructurales—, con las cuales transforma los sustratos que le proporcionan energía y unidades estructurales para la síntesis. La dotación genética establece los límites de cada organismo en su capacidad para transformar dichos sustratos.

La segunda variable es el *metabolismo intermediario de las células*. Los procesos mediante los cuales el organismo ingiere, altera y utiliza los sustratos metabólicos se hallan limitados por la herencia genética, pero la forma a través de la cual estos procesos se interrelacionan para permitir un movimiento ordenado de los sustratos, producción de energía y aporte de materiales para la síntesis a través de procesos intracelulares se halla determinada por las propiedades químicas y físicas de los sustratos y de las enzimas.

La tercera variable es el *control de las interrelaciones entre las células y los órganos*. Mientras que la regulación propia del metabolismo intermediario es normalmente intracelular, un animal complejo debe hallarse provisto asimismo de mecanismos de control más generales, que permitan integrar las actividades de los tejidos de tal manera que su acción coordinada beneficie al ser vivo en su conjunto. El sistema endocrino interrelaciona diversos órganos, con independencia de que las hormonas actúen en muchas ocasiones sobre el metabolismo celular.

La cuarta variable es el *suministro del sustrato al organismo*. En animales superiores, como en el caso del hombre, tenemos que

considerar los efectos de la nutrición sobre el organismo. También aquí, una vez más, las cuatro variables que acabamos de mencionarse hallan íntimamente relacionadas; el escorbuto, por ejemplo, es una enfermedad carencial que resulta de la ingestión insuficiente de ácido ascórbico en la dieta. El ácido ascórbico se necesita en el hombre porque las enzimas necesarias para formar esta sustancia no existen en el hombre, como resultado de un defecto hereditario en el metabolismo intermediario. En consecuencia, los requerimientos específicos de elementos nutritivos reflejan, más allá de una simple fuente de energía y de elementos esenciales, las peculiaridades de la herencia genética y del metabolismo intermediario de cada animal (3).

Las características individuales, la enfermedad y la salud se hallan controladas en último término por mecanismos genéticos. Esta conclusión de la moderna biología humana tiene sus raíces en la Medicina de los siglos XVIII y XIX pero, sin duda, ha alcanzado su preeminente posición en los últimos veinticinco años. El estudio de la *genética humana* ha sido responsable, y dependiente a la vez, de tres materias muy relacionadas: la genética de poblaciones consiste en el estudio de la distribución de genes específicos en distintas poblaciones y del impacto de dicha distribución en el mantenimiento de la frecuencia genética, selección natural y evolución. La citogenética se ocupa de la localización y organización de miles y miles de genes en los 46 cromosomas diploides propios del hombre. La genética bioquímica estudia la identidad química del gen y de sus productos, y de los mecanismos a través de los cuales la información contenida en los genes regula el metabolismo celular.

ALTERACIONES MOLECULARES CONGÉNITAS

Los errores metabólicos congénitos pueden definirse como alteraciones bioquímicas genéticamente determinadas que se deben a defectos específicos y congénitos en la estructura o función de las proteínas. Muchos errores congénitos tienen consecuencias clínicas y patológicas que constituyen el resultado directo de una alteración bioquímica específica, pero debe quedar bien claro que la importancia de estas alteraciones en el estudio de la biología humana va

mucho más allá de su impacto clínico. El estudio de los errores metabólicos congénitos ha sido un medio importantísimo en el establecimiento de los mecanismos y procesos bioquímicos normales.

El número y complejidad de los errores metabólicos conocidos se incrementa progresivamente y continuará aumentando a medida que se acelere el conocimiento de los mecanismos genéticos y bioquímicos propios de la naturaleza humana. Estos estudios tienen un impacto directo y progresivamente importante en la detección de las enfermedades, prevención, terapéutica y prognosis.

Las investigaciones sobre alteraciones metabólicas congénitas tienen dos objetivos independientes: el primero consiste en definir las implicaciones diagnósticas, terapéuticas y pronósticas directamente relacionadas con el estado clínico del paciente. El segundo consiste en comprender los acontecimientos bioquímicos y genéticos que son responsables de la alteración clínica. Cuanto más nos acerquemos a este objetivo, de una manera más racional podremos alcanzar el primero (4).

El estudio de unas alteraciones genéticas definidas pero poco frecuentes ha permitido, como veremos, aportar datos para el enfoque adecuado de otros múltiples estados patológicos no hereditarios y mucho más frecuentes. En esta exposición veremos cómo el profundo conocimiento de las alteraciones congénitas ha configurado un nuevo prisma para el estudio de la patología de la regulación y ha establecido, como en el caso de la fisiopatología neonatal, una clara diferenciación entre las características enzimáticas «adultas» y las de las actividades propias del período de transición, de acuerdo con las nuevas —y a veces abruptas, como sucede en el momento de nacer— condiciones de vida.

¿Cómo se inició el conocimiento de estas alteraciones? ¿En qué enfermedades se ha profundizado más? La contestación es evidente: se empezó por lo más aparente y se ha profundizado en lo más fácilmente disponible. Es decir, el estudio de estas alteraciones se inició en la alcaptonuria, porque es fácilmente visible al ennegrecerse intensamente los pañales de los niños, mientras que las hemoglobinopatías han sido las alteraciones conocidas con mayor detalle, por ser el tejido sanguíneo el más fácilmente asequible para su estudio... Si sobre la alcaptonuria Garrod fundamentó su hipótesis de las enzimo-

patías, los conocimientos adquiridos en las hemoglobinopatías han sido los que han permitido sentar las bases de su razón íntima y la explicación de múltiples alteraciones patológicas.

«Debemos pensar en los errores congénitos no como raras curiosidades de escasa significación clínica, sino como hitos en el camino de la comprensión de los mecanismos por medio de los cuales la expresión genética y la estructura proteica influyen en la variación individual y en la fisiología normal» (4).

El aporte de conocimientos que acerca de la *funcionalidad proteica* ha representado el estudio de las hemoglobinopatías es especialmente importante. La demostración en 1949, por Pauling y colaboradores, de la existencia de diferencias electroforéticas entre la hemoglobina normal y la procedente de un paciente de anemia falciforme, proporcionó gran estímulo a las investigaciones en este terreno y, fundamentalmente, dejó entrever, lo que después se confirmaría, la sutilidad de las reacciones enzimáticas, al revelar la repercusión de mínimas variaciones en la estructura primaria y por tanto cuaternaria de una proteína y en su funcionalidad. Se demostró en aquel momento que las enfermedades hereditarias podían ser comprendidas en términos moleculares. *La patología molecular iniciaba su camino.* Unos años más tarde, en 1957, Ingram demostraba que las modificaciones electroforéticas puestas de manifiesto en la anemia falciforme se debían a la sustitución de un solo aminoácido de las cadenas β de la hemoglobina.

El estudio en los sistemas microbianos ha permitido profundizar los conocimientos relativos a las mutaciones genéticas, a las mutaciones en los genes estructurales, controladores, en el operon, etc. La indiscriminada síntesis de δ-aminolevulínico sintetasa constituye un claro ejemplo de la ausencia de regulación producida por una mutación que inhabilita el correcto funcionamiento de un gene regulador. El estudio de las mutaciones de esta naturaleza, basado en la analogía existente entre los sistemas microbianos y los superiores, es muy importante en la elucidación de los mecanismos responsables de las características humanas.

Las alteraciones del metabolismo se comprenden, pues, ahora a nivel molecular y la definición de un defecto enzimático como caso particular ha permitido profundizar en el conocimiento de la siguiente

etapa de complejidad, la heterogeneidad molecular. Las moléculas de hemoglobina y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son los mejores ejemplos que han proporcionado claras indicaciones de cómo la variación genética entre los individuos determina sustituciones en los aminoácidos que componen la estructura proteica. La existencia de variaciones alélicas y no alélicas en las alteraciones congénitas del metabolismo está siendo progresivamente confirmada, así como el hecho de que estas alteraciones genéticamente condicionadas en la estructura enzimática conducen a diferencias muy considerables en el fenotipo y en la expresión clínica de la enfermedad genética.

En medicina, ha dicho Nyhan (5), la investigación sobre alteraciones congénitas del metabolismo de los aminoácidos ha proporcionado uno de los mejores ejemplos de cómo el desarrollo de la metodología ha hecho posible el descubrimiento de nuevas enfermedades y conocimientos, que permiten aplicar medidas terapéuticas y de regulación muy efectivas. Desde las reacciones colorimétricas, pasando por la cromatografía sobre papel, los autoanalizadores, la cromatografía en fase gaseosa, la resonancia magnética nuclear, ... media la diferencia de sensibilidad que ha permitido profundizar agudamente en las condiciones bioquímicas que caracterizan el estado de salud y diferenciarlas de aquellas que condicionan la enfermedad.

A la distinta naturaleza de la alteración a nivel molecular corresponde una distinta estrategia de compensación, es decir, una distinta estrategia terapéutica. En el caso de alteraciones moleculares congénitas no pueden aportarse las enzimas de cuya actividad se carece y, en consecuencia, se intenta soslayar la actividad deficitaria favoreciendo, normalmente mediante tratamietos dietéticos, los procesos sustitutorios pertinentes.

Ello obliga a su detección antes de que se haya producido el daño o lesión bioquímica en el nuevo ser. El diagnóstico precoz, la detección de transportadores y el consejo genético constituyen las bases principales de actuación en estos casos. Casos progresivamente más numerosos, porque desde 1952 en que se desmostró por primera vez la ausencia de glucosa-6-fosfatasa en una glucogenosis —cincuenta años después de que Garrod intuyera la causa de la alcaptonuria— ha sido incesante el incremento de nuevas enfermedades hereditarias puestas de manifiesto. Hoy se conocen alrededor de 1.800 alteracio-

nes, de las cuales hay más de 300 metabólicas, y en 100 se ha demostrado una lesión bioquímica determinada.

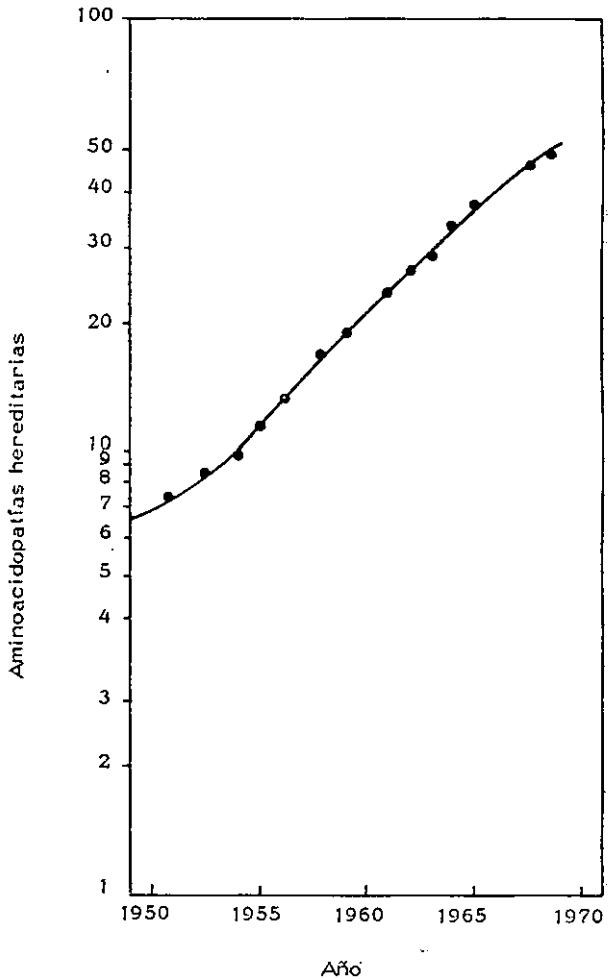

Fig. 1.—Descubrimiento de alteraciones moleculares del metabolismo de aminoácidos. La cifra acumulativa de aminoacidopatías descubiertas desde 1950 a 1970 se representa logarítmicamente en ordenadas (Scriver. 6).

Scriver (6) ha representado gráficamente los trastornos congénitos del metabolismo descubiertos en los años 1950 a 1970. Desde

el descubrimiento de Garrod a 1950, se habían puesto de manifiesto siete aminoacidopatías. Desde 1950 a 1970, 43, lo que supone un crecimiento exponencial (fig. 1).

Las bases moleculares de las alteraciones enzimáticas de origen genético han sido detenidamente revisadas (7). Las modificaciones en un gene regulador varían según ejerza dicho gene un control positivo o negativo. En un sistema de control negativo, si el regulador no funciona (mutación en un regulador negativo) se produce la ganancia recesiva de una actividad, mientras que en un sistema de control positivo dicha alteración se traduce en una pérdida de la misma. En ambos casos los heterocigotos no presentarán cambios en la actividad enzimática. Una mutación superrepresora en un sistema negativo producirá una pérdida dominante de función; una mutación constitutiva en un sistema positivo producirá, en principio, una ganancia dominante de dicha función. Entre las enfermedades recesivas podemos citar las *talasemias*, que pueden ser explicadas por mutaciones en el operador negativo —siempre que se trate de un sistema de control negativo— o por mutaciones del regulador en un sistema positivo. La enfermedad de Von Willebrand (anormalidades vasculares de carácter dominante, con deficiencia en el factor antihemofílico) puede ser debida a una mutación de tipo superrepresor. La porfiria hepática, caracterizada por un incremento de la aminolevulinato sintetasa, se explica por una mutación constitutiva del activador en un sistema de regulación positiva.

Sin embargo, la mayoría de las enfermedades enzimáticas congénitas, se deben a alteraciones en los genes estructurales. Una metodología recientemente elaborada y extraordinariamente sensible ha permitido poner de manifiesto la presencia de proteínas alteradas, inhábiles para el ejercicio de la función enzimática que les es propia, en la mayor parte de las enzimopatías. A través de procedimientos electroforéticos e inmunológicos se ha demostrado, en efecto, la existencia de proteínas totalmente inactivas o precariamente activas debido a mutaciones en los genes estructurales. La modificación genética conduce a unas proteínas enzimáticas consiguientemente alteradas, pudiéndose concluir que la inhabilidad para el cumplimiento de la función enzimática normal se debe a las causas principales siguientes:

a) Inestabilidad de la molécula; b) modificación de centros activos; c) alteración de un precursor, de tal manera que no se transforma en el componente activo.

Polimorfismo genético. Isoenzimas

Si alguna conclusión puede obtenerse, a estas alturas, de los principales procesos que regulan el metabolismo es el de su complejidad, el de la ausencia de límites bien definidos entre una situación y otra, entre un momento y el siguiente, entre un tejido y el próximo. Las fronteras son imprecisas, como corresponde a un conjunto de un extraordinario dinamismo, en que todo es cambiante, en el que los puntos de dependencia y de control son de una extraordinaria diversidad. Las aseveraciones tajantes pueden utilizarse desde un punto de vista pedagógico, pero teniendo bien presente la inmensa red de interconexiones e influencias recíprocas que caracterizan el funcionamiento de los seres vivos. Y así, veremos que no es correcto hablar de enzimas sino de isoenzimas y que, a medida que se profundiza en su estudio, surge, dentro de ellas, un *extraordinario polimorfismo*, hasta el punto de tener que referirnos, en aras a la precisión que no a la sencillez, a auténticas constelaciones de enzimas polimórficas, cuyo conjunto conduce a una situación de «normalidad» o de «anormalidad», según el grado de desviación que exista en relación a la conducta estadísticamente apropiada para el ejercicio de la función metabólica de cada enzima.

Los genes mutantes que producen las enfermedades genéticas se hallan con una frecuencia del 0.05-0.001 en la población general. Cuando una deficiencia enzimática se halla con mayor frecuencia en determinadas poblaciones —tales como la deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa— debe suponerse que ha existido alguna circunstancia selectiva que favorece la mutación y su permanencia (por ejemplo, la deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se da con especial frecuencia en zonas donde la malaria es endémica). Nos referimos, claro está, a las variaciones en la estructura proteica enzimática que producen una situación patológica, porque son muchas las modificaciones previsibles que no alteran la funcionalidad de la

enzima. El polimorfismo genético —y en consecuencia, enzimático— se refleja perfectamente en los sistemas proteicos eritrocitrarios, sean o no enzimáticos. La mayoría de las proteínas de un organismo tendrán sutiles diferencias, lo que permite un alto grado de individualidad a nivel molecular, como lo acreditan, por ejemplo, las huellas dactilares distintas en cada hombre, y como corresponde, desde luego, a seres en los que se calcula la existencia de alrededor de un millón de mutaciones diarias en sus células. Esta cantidad parece exagerada, pero lo es menos si se considera el número total de células de un organismo superior y la velocidad del número de cambio celular o de síntesis (por ejemplo, en el varón se producen alrededor de 100 millones de espermatozoides al día).

El polimorfismo genético conduce, dentro de lo que podríamos denominar las características de la individualidad bioquímica, a sustanciales diferencias en la estructura de las isoenzimas responsables de una determinada actividad. Así, por ejemplo, la modificación de un determinado aminoácido en la estructura de una isoenzima, puede carecer de repercusiones en la disposición espacial de la molécula y no afectar, por tanto, de manera sensible la actividad enzimática. En cambio, otra sustitución —o la misma en otra isoenzima— puede afectar en alto grado la capacidad enzimática y producir, en consecuencia, alteraciones patológicas y clínicas de primer orden. Del mismo modo que sucede en el caso de los componentes proteicos del estroma eritrocítico que conducen a la existencia de múltiples tipos sanguíneos, también son diversos los tipos de isoenzimas que se hallan presentes en los distintos individuos, hasta el punto de caracterizar a los procedentes de diversas regiones, comunidades étnicas, etc. Este es el caso de la *fosfoglucomutasa* (8): el fenotipo PGM_1 1 se encuentra en el 58 por 100 de las poblaciones europeas y se halla compuesto por las isoenzimas *a* y *c*: el fenotipo PGM_1 2 se halla en cambio únicamente en el 6 por 100 de los europeos y consta de las isoenzimas *b* y *d*; el fenotipo PGM_1 2-1 se halla en los eritrocitos del 36 por 100 de los europeos y tiene las cuatro isoenzimas *a*, *b*, *c* y *d*. Los estudios genéticos han demostrado que todos estos fenotipos son determinados genéticamente y que su herencia depende de dos alelos. Los tipos 1 y 2 son homocigóticos y el tipo 2-1 es heterocigótico. El alelo que determina la presen-

cia de las isoenzimas *a* y *c* se halla presente con una frecuencia tres veces superior a la del otro alelo que determina las isoenzimas *b* y *d*. Junto a estos fenotipos normales, se encuentran otros fenotipos (con una incidencia de 1 en 750) infrecuentes, originados por la combinación heterocigótica de los alelos normales con otro u otros anormales en el mismo locus cromosomático. Cada alelo anormal determina asimismo la presencia de dos isoenzimas. En estos momentos se conocen las combinaciones 3-1, 3-2, 4-1, 4-2, 5-2, 6-1, 6-2, 7-1, 7-2, 8-1, 8-2 (fig. 2). ¿Cuál es la significación metabólica de estas variantes? Los alelos infrecuentes conducen en ocasiones a cambios patológicos, produciendo defectos funcionales dado que la proteína resultante tiene una inferior estabilidad o presenta alteradas sus propiedades cinéticas. Los datos son muy preliminares, pero no cabe duda de que un profundo estudio de este apasionante campo conducirá al establecimiento de diferencias cuali y cuantitativas entre las formas polimórficas de las enzimas, lo que permitirá un mejor conocimiento de la significación biológica del polimorfismo genético. Como ha puesto de manifiesto Hopkinson es muy probable que sea la *constelación particular de enzimas polimórficas* y de las proteínas de un individuo, y no las características de una sola proteína o enzima, la que conduzca a las diferencias individuales en el metabolismo y desarrollo, así como a las diferencias entre los distintos individuos en susceptibilidad o respuesta a los diferentes tipos de procesos patológicos.

Desde que Garrod formuló el concepto de error metabólico congénito, se ha ido descubriendo que la variación genética puede expresarse por la alteración de actividades enzimáticas, estableciéndose las relaciones existentes entre el genoma y el fenotipo bioquímico. Al principio se pensó que la multiplicidad enzimática era un fenómeno excepcional. Ahora podemos empezar a pensar que es la norma y no la excepción.

¿Qué mecanismos se hallan implicados en el control de las distintas cantidades que se producen de las diferentes formas isoenzimáticas de una enzima dada? El análisis de los mecanismos responsables de cambios en el espectro isoenzimático puede revelar importantes conocimientos sobre la fisiología celular y la diferenciación. La multiplicidad de formas moleculares con actividad idéntica o similar

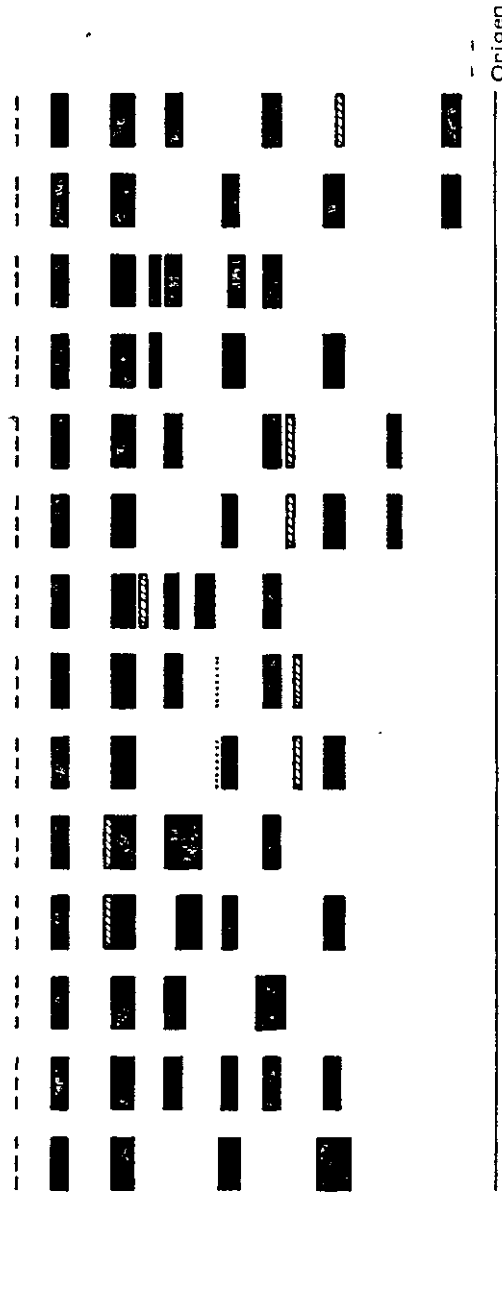

Fig. 2.—Diagrama de las isoenzimas eritrocitarias de la fosfoglucomutasa en catorce fenotipos PGM_1 distintos (8).

en un mismo organismo es un hecho de gran importancia no sólo aplicable a las enzimas sino a proteínas no enzimáticas.

El mecanismo más común para la formación de isoenzimas incluye la asociación de subunidades no idénticas en grupos de estructuras multiméricas relacionadas. Una simple alteración de la estructura peptídica de una de las subunidades puede tener grandes repercusiones, afectando, por ejemplo, la afinidad por el sustrato o las propiedades catalíticas... hasta permitir casi ilimitadas variaciones en los mecanismos de regulación metabólica. La regulación de la expresión de los «pattern» isoenzimáticos específicos de tejidos, órganos y etapas de cada uno de ellos puede constituir una de las principales vías por las que el organismo se adapta para poder hacer frente a los específicos requerimientos metabólicos de cada momento.

Cada una de las unidades que integra un multímero depende de mecanismos de regulación genéticos, a nivel del genoma, y epigenéticos. Los principales factores epigenéticos son: a) Modificación química de las subunidades que integran las distintas isoenzimas; por ejemplo, unión de NAD y NADP; unión de ácido siálico; oxidación o reducción de grupos tiólicos; unión a glutation o cisteína; fosforilación; acetilación; adenilación; desaminación; etc. b) Modificación del tamaño de las moléculas enzimáticas. Puede realizarse tanto por cambio del número de aminoácidos que integran la secuencia politeptídica como por el número de subunidades que integran el polímero. Así, la carboxipolipeptidasa A_1 pasa a carboxipolipeptidasa A_2 mediante la simple separación de un dipéptido. Y la glutamato deshidrogenasa es activa como monómero, dímero, tetrámero, y otros multímeros. El grado de polimerización depende de diversos factores, que afectan el número de moléculas que se unen. En este caso, se trata de una modulación de actividades en razón del número de subunidades que se agrupan. c) Modificaciones conformacionales de las subunidades, que alteran la estructura cuaternaria mediante cambios de pH, fuerza iónica, etc.

La distribución de las isoenzimas no sólo se realiza por tejidos, sino dentro de un mismo tejido u órgano, como sucede en el caso del riñón, que tiene unas isoenzimas de lactato deshidrogenasa características de la corteza y de la médula. Pero, dentro de una misma célula, la compartimentación celular constituye un factor adicional

de regulación, ya que son distintos los sistemas enzimáticos que tienen unas características definidas según se hallen en la mitocondria, en el citosol, etc.

Bien entendido que los factores epigenéticos dependen a su vez —en cuanto conocemos y seguramente en cuanto nos queda por conocer— de otras actividades enzimáticas. La adenilación, la fosforilación, la presencia de nucleótidos, el pH en el que la reacción se desarrolla, dependen a su vez de otras actividades enzimáticas. De donde se deduce que todo puede interpretarse a la luz de la síntesis enzimática y de su regulación, dado que la propia actividad depende del aporte y presencia de unos factores condicionados a su vez al exacto funcionamiento de la expresión genética.

Si no existe modificación a nivel genético, la alteración puede radicar en el sistema de traducción, de lectura, de producción de la proteína a partir de la información genética. Debe reiterarse, en consecuencia, que todo recae, incluido el equilibrio a nivel de reacción, sobre la expresión genética y su regulación.

La heterogeneidad genética puede resultar de mutaciones alélicas o no alélicas, es decir, un fenotipo común puede ser producido por más de una mutación simple en un locus genético (alélico) o por mutaciones en distintos locus cromosomáticos (no alélicos). A su vez, las mutaciones alélicas pueden ser subdivididas en dos grupos: las homoalélicas, como en el caso de la hemoglobina S, en las cuales existen sustituciones de aminoácidos en el mismo punto de la cadena polipeptídica: y mutaciones heteroalélicas, en las cuales las sustituciones de aminoácidos tienen lugar en distintos puntos de la cadena polipeptídica o tienen lugar distintas formas de mutaciones en un locus específico. Así, la hemoglobina S se produce por una mutación en un punto concreto y bien establecido del locus propio de la cadena β mientras que la hemoglobina Gun-Hill resulta de una pequeñísima deleción de dicho locus.

Debe destacarse que todas las conclusiones sobre regulación enzimática se han obtenido, normalmente, a partir de datos hallados «in vitro». ¿En qué medida se cumplirán estas conclusiones «in vivo», en el seno celular, en las condiciones microecológicas propias de la localización donde cumplen su cometido? A este respecto es previsible que las investigaciones realizadas con células permeabilizadas

o parcialmente permeabilizadas, viendo los efectos sobre las enzimas «in situ», aporten resultados de excepcional interés. Desde luego, como ha puesto de manifiesto Schapira (9), es difícil y arriegado obtener conclusiones de las determinaciones «in vitro» sobre el comportamiento de las enzimas «in vivo», ya que pueden existir notables diferencias entre ambos comportamientos. Sin embargo, la observación de diferencias de actividad entre las formas polimórficas representa un paso importante hacia la comprensión de la significación biológica del polimorfismo genético. La elucidación final de este problema tardará en establecerse, ya que las consecuencias metabólicas de la acción de cada gen se hallan influenciadas por las de otros muchos. Como ya hemos comentado, es la constelación particular de enzimas y de proteínas polimórficas la que gobierna las diferencias individuales del metabolismo y la diversidad de susceptibilidad y de respuesta de los diversos individuos a las diversas circunstancias patológicas, y no los caracteres específicos de una sola de estas enzimas. En lo que atañe a las actividades «in vivo», Sols y colaboradores han iniciado el estudio de la regulación de las enzimas «in situ» (10).

La aparición de variantes resistentes a diversas condiciones, bien sea por mutaciones en genes estructurales o como consecuencia de cambios epigenéticos, ha sido tratada con extensión (11).

Las mutaciones que pueden tener lugar a nivel de los tripletes en las secuencias de los ácidos nucleicos pueden producir:

a) La sustitución de un aminoácido por otro, ya que la mutación produce un triplete que tiene como expresión otro aminoácido.

b) La mutación puede dar lugar a un triplete «sin sentido», es decir, sin capacidad de traducción, de tal manera que la proteína que se sintetice tendrá unas características totalmente distintas a la original, ya que su producción se detendrá en el triplete «sin sentido».

c) La estructura del triplete modificado sigue siendo traducida por el mismo aminoácido, de tal manera que a pesar de haber existido una mutación no hay cambio alguno en la calidad de la proteína producida.

La afectación de un gene estructural puede conducir, según se ha visto, a una molécula más inestable, a una modificación de su centro

Tabla 1

Substitución de bases en la cadena de DNA transcrita

	Variantes de Hb	Hb: β → δ Substitución + distintas cadenas	Hb: Mb → α → γ → β	Cadenas de γ-globulina lábiles	Insulina	Citocromo c	Proteínas TMV	Total
TA → G	9	1	4	17	3	3	3	40
= G → A	8	3	6	15	1	7	5	45
T → C	22	3	18	71	7	10	11	142
C → T	32	1	20	58	3	17	11	142
Transiciones:								
Dudosas	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	71	8	48	161	14	37	30	369
TV A → T	4	2	4	10	0	5	8	33
= T → A	3	0	5	26	2	3	3	42
A → C	5	0	11	11	1	2	6	36
C → A	5	1	7	12	1	3	5	34
G → T	9	3	6	8	2	4	5	37
T → G	11	1	9	25	1	9	2	58
G → C	12	1	12	12	0	4	3	44
C → G	15	0	8	18	1	6	4	52
Transversiones:								
Dudosas	12	5	30	77	8	24	14	170
Total	76	14	92	199	16	60	50	507
Dudoso	4					1	1	

activo o bien a la producción de defectos de transformación desde precursores inactivos a enzimas activas.

Las mutaciones pueden originarse, entre otras causas, por transiciones (sustitución de una purina por otra purina) o transversiones, es decir, sustitución de una purina por una pirimidina (fig. 3). En la tabla I se recogen algunos ejemplos característicos de mutaciones originadas por transiciones o transversiones (12).

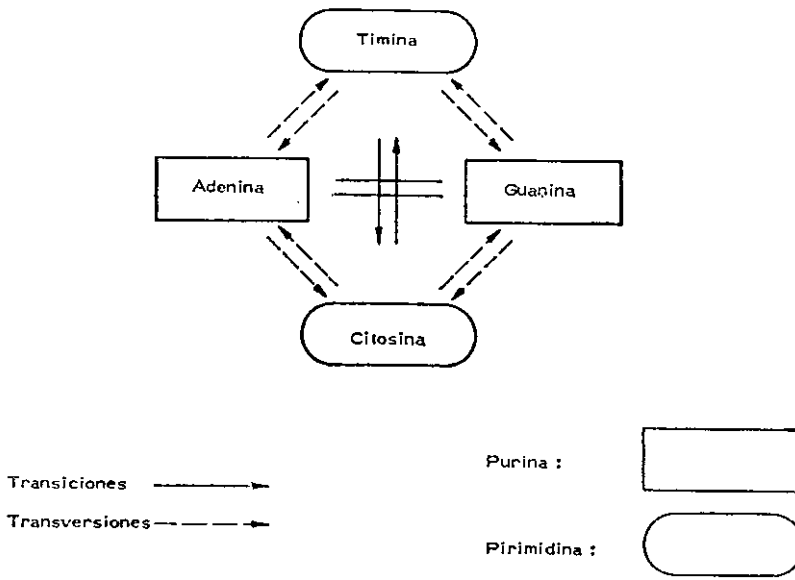

Fig. 3.—Esquema de transversiones y transiciones entre las bases púricas y pirimidínicas (12).

Con el fin de comprender mejor los aspectos ontogénicos y filogénicos de las isoenzimas y su papel en la diferenciación y en la regulación metabólica, conviene que nos extendamos un poco en los mecanismos genéticos y epigenéticos que controlan el polimorfismo enzimático.

Regulación genética y epigenética

Como ya hemos mencionado, los mecanismos por los cuales se originan múltiples formas de proteínas, enzimáticas o no, son (13):

a) Mecanismos que operan a nivel de genoma regulando la transcripción de distintas secuencias de DNA (bien de múltiples genes o alelos) que producen distintos tipos de mRNA y por ende distintas cadenas polipeptídicas.

b) Por mecanismos epigenéticos que modifican a los polipéptidos en mayor o menor grado (por ejemplo, por degradación parcial o modificación covalente).

A) *A nivel de genoma*

Formación de isoenzimas por asociación de subunidades distintas.

1) *Genes múltiples*

Se conocen isoenzimas procedentes de la unión de polipéptidos codificados por genes distintos. Diferentes genes estructurales forman distintas secuencias monopeptídicas. Las isoenzimas activas resultan de la asociación de las cadenas polipeptídicas así formadas en diferentes estructuras cuaternarias. De este modo, los conjuntos de isoenzimas con propiedades catalíticas similares resultan de la asociación de cadenas polipeptídicas heterólogas, es decir, procedentes de distintos «locus» genéticos. Estas isoenzimas se distinguen, por tanto, de aquellas otras en las que una sola estructura cuaternaria resulta de la asociación de subunidades distintas, como en el caso de la aspartil transcarbamilasa. A lo largo de la evolución, los múltiples locus genéticos han sufrido mutaciones, de tal manera que en la actualidad hallamos formas monoméricas activas en algunas enzimas, conjuntamente con formas multiméricas igualmente activas. Es el caso de la arginín-cinasa, enzima importante para la transferencia de enlaces ricos en energía desde ATP a fosfágenos. Se considera (13) que existe una forma ancestral de arginina-cinasa (Ac), monómero, resultante de un gene que codificaba una cadena única.

Duplicaciones sucesivas condujeron a la existencia de varios genes que producían polipéptidos análogos y autoagregables, formando multímeros homólogos activos (divergencia evolutiva). Algunos descendientes modernos tienen Ac, tanto monomérica como multimérica, sola o asociada a otras enzimas que usan como sustratos fosfágenos de distinta estructura, pero en los que siempre se halla el grupo guanidínico de la arginina. Si actúan sobre el mismo sustrato son isoenzimas; en otro caso, enzimas relacionadas.

De acuerdo con esta hipótesis, las tres formas comunes en los vertebrados de creatina cinasa resultarían de la actividad de dos locus genéticos que codifican dos polipéptidos de composición monopeptídica bastante diferente. Estos monómeros M y B pueden asociarse para constituir dímeros activos, tanto homólogos (MM, BB) como heterólogos (MB). Algo parecido sucede con la aldolasa: las isoenzimas conocidas hoy se derivarían de genes procedentes en el pasado por duplicación y evolución del gene ancestral. En efecto, existen tres locus genéticos que codifican la aldolasa: Ald-a, Ald-b y Ald-c. Se conocen tetrámeros activos que contienen subunidades A y C o A y B. Incluso, en etapas muy iniciales del desarrollo, existen tetrámeros formados por subunidades B y C (en hígado de pollo). Por asociación de tres subunidades en tetrámeros resultan doce isoenzimas de la aldolasa. Asimismo, en el caso de la láctico deshidrogenasa (LDH) existen dos locus genéticos (LDH-a y LDH-b), que codifican las subunidades A y B, que se integran en tetrámeros activos, homo o heterólogos, formando cinco isoenzimas: A4, A3B, A2B2, AB3 y B4. Se conoce otra subunidad, la C, derivada del locus LDH-c, pero que sólo se agrega consigo misma, formando el holotetrámero C4.

2) *Isoenzimas alélicas*

La transcripción de múltiples alelos en un solo locus genético constituye otro sistema para la génesis de isoenzimas. En efecto, existen distintos alelos de un único locus genético, cada uno de los cuales produce una secuencia polipeptídica ligeramente modificada. Los heterocigotos se identifican normalmente por la presencia de dos formas electroforéticamente separables. En el caso de moléculas po-

liméricas resultan formas mucho más complejas por asociación de las subunidades en heteropolímeros. Contrariamente al caso de los genes múltiples, aquí las diferencias entre las cadenas se restringen a uno o dos aminoácidos. La alcohol deshidrogenasa de maíz y de *Triticum dicoccum* son buenos ejemplos de isoenzimas de esta naturaleza. En ambos casos existen dos formas de ADH, la ADH-1 y ADH-2, codificadas por dos locus genéticos independientes. En el caso del maíz, ambos locus son dialélicos, cada uno de los cuales produce una variante más rápida (F) en relación con otra (S) en la emigración electroforética. En el caso de la ADH-2 se identifica en heterocigóticos una variante de emigración intermedia, lo que hace pensar que se debe a la formación de un dímero híbrido ($ADH\text{-}2^F$ + + $ADH\text{-}2^S$). En la ADH-1 no se han detectado híbridos en los heterocigotos, lo que parece sugerir que en este caso se forman únicamente dímeros homólogos ($ADH\text{-}1^F$ + $ADH\text{-}1^F$ y $ADH\text{-}1^S$ + + $ADH\text{-}1^S$).

En el *Triticum* cada locus codifica independientemente polipéptidos que después se unen formando dímeros. En el locus ADH-1 existen probablemente los alelos codominantes $ADH\text{-}1_1$ (polipéptido A_1) y $ADH\text{-}1_2$ (polipéptido A_2), dando las siguientes isoenzimas en conjunto, al unirse con el polipéptido B, producido por ADH-2:

Homocigotos $ADH\text{-}1_1$: $A_1 A_1$, A_1 B, BB.

Homocigotos $ADH\text{-}1_2$: $A_2 A_2$, A_2 B, BB.

Heterocigotos $ADH\text{-}1_1/ADH\text{-}1_2$: $A_1 A_1$, $A_1 A_2$, $A_2 A_2$, A_1 B, A_2 B, BB.

En el caso de enzimas homopoliméricas se conocen variantes alélicas del gene responsable de la síntesis de la misma subunidad que se autoagrega. En los heterocigotos se forman isoenzimas por asociación de heteropolímeros de subunidades «normales» y «variantes». La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa tiene un gran número de alelos conocidos en un locus genético bien definido del cromosoma X humano.

B) *Mecanismos epigenéticos*

1) *Modificación química de las subunidades.*

Unión de diversas moléculas que producen heterogeneidad electroforética en las subunidades: NAD, glutation, cisteína, fosforilación, adenilación, acetilación, etc., etc.

2) *Modificación del tamaño.*

Por ejemplo, la carboxipolipetidasa A-1 pierde —como se ha indicado— un dipéptido por acción de una peptidasa específica, transformándose en carboxipolipetidasa A-2. La actividad de ambas enzimas es, sin embargo, idéntica. Este es un ejemplo de reducción del tamaño. Hay otros en los cuales el tamaño se incrementa: la glutamato deshidrogenasa muestra actividad como monómero, dímero, tetrámero, hexámero... e incluso polímeros de mayor complejidad. Existen moléculas que afectan el grado de agregación, lo que es importante al considerar las formas de regulación «in vivo».

3) *Isoenzimas conformacionales.*

Cambios en la estructura secundaria o terciaria por modificaciones microecológicas tales como temperatura, pH o fuerza iónica.

4) *Especificidad tisular.*

La lactato deshidrogenasa, creatinacinasa y aldolasa constituyen los ejemplos más conocidos de específica distribución tisular. Pero, como ya se ha mencionado, dentro del mismo tejido pueden existir también diferencias en la composición isoenzimática: la distinta naturaleza isoenzimática de la médula y corteza renal ilustra perfectamente esta variedad. Por último, existe una compartimentación celular que constituye un factor adicional de regulación y de diferenciación en lo que a la localización de las subunidades se refiere.

ISOENZIMAS Y DIFERENCIACIÓN

Eppenberger (13) ha estudiado con gran detalle las características isoenzimáticas de los diversos tejidos durante el desarrollo, haciendo expresa mención de los factores genéticos y epigenéticos implicados. También Masters y Holmes (14) han tratado muy extensamente, en una reciente revisión, los aspectos filogénicos y ontogénicos de las isoenzimas.

En efecto, el aspecto más importante a considerar son los cambios en la distribución de las *isoenzimas durante el desarrollo*. Estas transiciones isoenzimáticas apuntan directamente a los acontecimientos moleculares que condicionan la diferenciación celular. Se ha estudiado en embriones y células cultivadas «in vitro». Los distintos tipos de células presentan distintos repertorios de enzimas en proporciones distintas, que reflejan tanto las cambiantes necesidades metabólicas en el organismo en desarrollo como la fisiología celular alterada por la especialización celular.

Como ha puesto de manifiesto Eppenberger (13), el conocimiento de la regulación de los cambios isoenzimáticos en los sistemas en desarrollo constituye hoy el camino más prometedor para la comprensión de la diferenciación celular.

Se ha demostrado en muchas especies que cada célula de un organismo multicelular contiene la misma dotación cromosómica y, por tanto, el mismo potencial genético. En esta situación, ¿qué mecanismos serán responsables del proceso de diferenciación que hace que la estructura y función de una célula hepática sean tan distintos de una célula muscular? Es muy poco lo que se conoce acerca de la diferenciación en el organismo humano pero se puede inferir, a partir de estudios realizados en organismos multicelulares inferiores, que el proceso de diferenciación depende de una sutil interacción entre sustancias citoplasmáticas y nucleares que se producen en momentos muy específicos y determinados del desarrollo del organismo. Queda claro que no sólo se trata de conectar y desconectar la expresión genética en determinadas etapas, sino que existe una modulación cuantitativa. Es decir, no sólo se relacionan unos genes determinados, sino que se modula el desarrollo cinético de su expresión.

El control principal puede ejercerse *a nivel de genoma*, ya que la existencia de cuadros específicos de isoenzimas multiméricos se basa en un proceso de diferenciación en el cual se acepta que los genes son diferencialmente activos en células diferentes y a diferentes tiempos durante el desarrollo. Durante el desarrollo, el genoma está en una forma de gran dinamismo siendo sus genes conectados y desconectados alternativa o sucesivamente. ¿Pero cómo se controla esta conexión y desconexión en células eucarióticas? Porque los procariotes no sirven como modelo paralelo, a los efectos de comparación de estos fenómenos. Una posibilidad es, ciertamente, la conexión o desconexión de los genes correspondientes a distintas etapas del desarrollo de los distintos tejidos. El conocimiento de los factores que controlan los niveles de isoenzimas aportará, sin duda, mucha luz para la comprensión de los mecanismos de regulación de la expresión genética en eucariotes.

La subunidad C de la LDH es un buen ejemplo de control por conexión-desconexión. Esta subunidad forma isoenzimas LDH en los espermatozoides y testículos de algunos mamíferos y aves (15). Su presencia depende del grado de maduración de la espermatogénesis. En cuanto las espermatogonias pasan a espermatocitos la producción de la subunidad C se «dispara». Se ha propuesto que la meiosis produce una señal para la activación en los testículos del cistrón responsable de la producción de la subunidad C. «In vivo» no se hallan híbridos entre las subunidades C y las A o B, también presentes en las mismas células, aunque «in vitro» se han obtenido los heterotetrámeros correspondientes. Se ha propuesto que el gene C sea el resultado de una duplicación evolutiva, simultánea o no del momento en que, a partir de un gene ancestral, se originaran los genes A y B. Los sistemas de regulación de la expresión genética del C serán distintos a los que regulan los A y B.

Otro ejemplo lo constituyen la creatina cinasa y la aldolasa en cultivos de células musculares. Existe una clara correlación entre la fusión «in vitro» de células miogénicas en miotúbulos multinucleados y el incremento de proteínas musculares tales como la miosina o enzimas como la creatinacinasa o la aldolasa (15). Si la fusión se obstaculiza por déficit en calcio o la presencia de 5-bromo-deoxiuridina en el medio, no se produce transición isoenzimática alguna. Median-

te adición de actinomicina D se ha podido demostrar que el RNA necesario para la síntesis de las subunidades de creatinacinasa existe ya seis horas antes, como mínimo, de la fusión de los mioblastos. El reemplazamiento de una isoenzima por otra representa una etapa de diferenciación que proporciona a un tipo determinado de célula la isoenzima mejor capacitada para llevar a cabo las nuevas responsabilidades funcionales.

Control a nivel del cromosoma total

Si se considera una activación asíncrona de los alelos, el material genético paterno en un híbrido interespecífico es probablemente muy distinto de las células maternas, y los factores citoplasmáticos del huevo no son capaces de reconocer y activar al alelo paterno («efectos maternos sobre las isoenzimas»). Se trataría de una incompatibilidad nucleocitoplasmática. Es mucho, ciertamente, lo que se ha escrito sobre interacciones nucleocitoplasmáticas, efectos hormonales sobre interacciones nucleocitoplasmáticas, efectos hormonales sobre el genoma y alteraciones del catabolismo del RNA. Desde luego, la inducción hormonal constituye una posibilidad muy razonable y es un buen ejemplo de interacciones nucleocitoplasmáticas. Así, el estradiol administrado a fetos de ratas y conejos estimula preferentemente la síntesis de las subunidades A de la lactato deshidrogenasa. Este efecto es contrarrestado por la actinomicina D.

También el oxígeno afecta a la aparición de isoenzimas LDH: en un cultivo celular de corazón de mono mantenido a concentraciones de oxígeno del 10 por 100 o menores, se incrementa sustancialmente la subunidad A, que es tanto mayor cuanto menor la concentración de oxígeno. El proceso se inhibe, asimismo, en presencia de actinomicina D.

En una reciente revisión de la regulación hormonal perinatal (17) he comentado ampliamente el efecto del glucagon sobre la aparición de actividades enzimáticas en los períodos pre y neonatal. Puede concluirse que todo el fenómeno de la acción hormonal se inscribe en este contexto que acabamos de revisar panorámicamente: la respuesta a los factores hormonales dependerá de la naturaleza de la isoenzima de que se trate y del entorno en el que realiza su acción.

Así, la presencia de diversos factores de influencia, las circunstancias microecológicas, decidirán la actuación, en mayor o menor grado, de una determinada enzima. La respuesta a una acción hormonal se ejercerá, por tanto, según sea el grado de diferenciación intrínseca, ya que según la etapa de diferenciación así serán las características de las isoenzimas y, por ende, su respuesta a la acción hormonal. La maduración de los receptores hormonales, es decir, su grado de sensibilidad depende de los fenómenos moleculares inherentes a su composición y de los que regulan la expresión de su genoma.

Akamatsu y colaboradores (18) han descrito con detalle el efecto inhibidor de la hormona juvenil sobre la lectura del programa genético que promueve la diferenciación y desarrollo, bajo el control activo de la ecdisona. Antes de la metamorfosis de la larva, decrece la concentración de hormona juvenil y empieza a producirse el desarrollo. La hormona juvenil aparece más tarde, para estimular el desarrollo del sistema reproductor del insecto. La esencia de la diferenciación es, pues, una expresión genética diferencial. Los distintos tipos de células de un organismo multicelular son diferentes en el sentido en que expresan diferentes conjuntos de genes (así, las células musculares leen los genes que codifican las proteínas musculares, las células pancreáticas los genes que codifican los enzimas digestivos, etc.). La expresión genética se reconoce por la velocidad de síntesis de una proteína determinada, visualizada por la acción que le es propia.

En cuanto al *control epigenético de la diferenciación*, la degradación de proteínas es importante en el estado estacionario, pero es muy escasa en los tejidos en diferenciación. No se sabe con detalle si las proteínas se degradan porque aparecen en un momento dado las enzimas específicas o los efectores que les permiten actuar sobre una proteína determinada o se trata de una proteolisis inespecífica, en cuyo caso las diferencias de la degradación serán consecuencia de una susceptibilidad diferencial a las proteasas (protección por efectores o sustratos, factores que favorecen la asociación-disociación, siendo las formas poliméricas, por ejemplo, más estables que las monoméricas). Es evidente la extraordinaria importancia que reviste, a este respecto, el conocimiento de la agregación de subunidades y de la estabilidad de los polímeros.

Volviendo a la LDH, la unión de unas subunidades con otras, de manera específica, dependerá obviamente de las condiciones microecológicas que favorezcan la agregación o la disociación: así, el heteropolímero AA BB será estable en unas condiciones en las que el A4, por ejemplo, estaría disociado. En el tejido cardíaco adulto (condiciones estacionarias) las síntesis de LDH-B4 es aproximadamente ocho veces mayor que la de A4, mientras que la degradación de B4 es unas ocho veces menor que la de A4, de lo que resulta un claro predominio de tetrámeros B4 y B3A en el tejido cardíaco. Sin embargo, en el músculo esquelético la síntesis de A4 y B4 es prácticamente igual, pero la degradación de la forma A4 es unas 25 veces menor que la de los tetrámeros B4, lo que produce un claro predominio de los polímeros A4 y A3B (19). En cambio, no se han hallado diferencias en la formación y despolimerización de los multímeros activos de las aldolasas.

La influencia de los efectores en enzimas altamente reguladas es, seguramente, la clave más importante, no sólo para su actividad sino para su estabilidad y conformación específica. Meléndez y Municio (20) han puesto de manifiesto la importancia del NAD en la regulación alostérica de la actividad LDH.

Por último, en los animales poiquilotermos, es muy importante el efecto de la temperatura, habiéndose observado, por ejemplo, que al descender la temperatura se incrementa la proporción de isoenzima con mayor afinidad, es decir, con una Km más baja.

Isoenzimas en tejidos fetales y neoplásicos

Es evidente que existe una enzimología fetal, que existe una enzimología específica del neonato, tanto más acusada y menos diferenciada cuanto menos maduro es el nuevo ser en el momento de nacer (el hombre es el ejemplo más característico, si bien algunos animales de experimentación, como la rata, son también extraordinariamente inmaduros). En términos generales, la característica de las enzimas fetales y del neonato es que son más «primitivas», menos regulables que las del adulto. De entre las diferentes isoenzimas siempre son las formas de proceder menos complejo las que se hallan en el híga-

do, cerebro y tejidos del neonato. Existe, pues, una clara indiferenciación, como si se quisiera asegurar que los procesos que súbitamente deben ponerse en marcha al adquirir el nuevo ser su autonomía vital, al desligarse de la tutela materna, podrán proceder con la velocidad exigible en los primeros momentos, sin hallarse condicionados por los complejísimos mecanismos de regulación que más tarde aparecen, cuando los distintos órganos han alcanzado lo que podríamos denominar su plenitud fisiológica, acentuándose la interdependencia y la influencia mutua, propia de un estado de equilibrio metabólico.

El planteamiento anterior, extraordinariamente lógico, es de una gran importancia y obliga a revisar no pocas conclusiones alcanzadas hasta este momento, ya que se partía de las propiedades características de las enzimas en una especie determinada, sin tener en cuenta que se estaban explicando efectos hallados en el neonato con las características enzimáticas de las enzimas aisladas a partir de órganos del adulto. En consecuencia, la única referencia válida para explicar el comportamiento de las enzimas en la patología del neonato es la de las características de dichas enzimas en el neonato normal, debiendo proceder a establecer dichas características enzimáticas como punto de referencia inequívoco.

En algunos estados patológicos (tumores, distrofias, etc.) se produce, aparentemente, la reversión de las transiciones isoenzimáticas asociadas al desarrollo normal. En otras palabras, se vuelve al «pattern» fetal. Lo importante es saber si realmente se produce la reversión, es decir, si el regreso a la forma fetal es verdadero o aparente, porque en algunas enfermedades distróficas existen grandes proporciones de fibroblastos, lo que podría producir un cambio aparente (16). ¿Se trata de una desdiferenciación de los tejidos afectados o es el resultado de una proliferación de tipos de células anormales?

Las alteraciones metabólicas y estructurales del tejido neoplásico fueron revisadas y expuestas muy sugestivamente por Pasternak (21). La significativa *analogía que existe entre múltiples enzimas fetales y neonatales con las halladas en tejidos neoplásicos* llevó a Potter, en 1972, a reiterar el origen embrionario del cáncer diciendo: «la oncogenia es una ontogenia interrumpida». Parece intere-

sante, en consecuencia, discernir las diferencias que existen —si es que existen realmente— entre la enzimología perinatal y la tumoral. Para establecer analogías y diferencias es preciso, en primer lugar, no considerar las actividades enzimáticas *totales*, sino cada uno de los sumandos, es decir, las propias de las isoenzimas existentes, ya que los ensayos de actividad total pueden enmascarar profundas alteraciones en las isoenzimas responsables, de tal manera que aún en el supuesto de hallar una actividad enzimática total del mismo valor que en el neonato normal, pueda ser debida íntegramente, o en una gran parte, a una isoenzima que en circunstancias normales contribuye en mucha menor proporción a la actividad total, o, incluso, se halla ausente en el tejido examinado. La diversidad debe investigarse no sólo en una distinta velocidad de crecimiento o diferenciación histológica, sino en los mecanismos moleculares básicos. Es significativo que, en el desarrollo tumoral, se hallen decrecidas o ausentes las actividades de aquellas enzimas más reguladas: en efecto, las isoenzimas más acopladas a la función son reemplazadas por otras no reguladas por el huésped, pero extraordinariamente eficientes en la utilización de los sustratos energéticos, como era de esperar que sucediera en una alteración patológica que se caracteriza por la pérdida del control ejercido por el huésped sobre la proliferación celular, cuya velocidad de crecimiento se halla fuertemente incrementada.

Es ciertamente atractivo considerar la posibilidad de que la expresión aberrante de los genes que codifican isoenzimas en los tejidos neoplásicos constituya un proceso ordenado: por ejemplo, la reversión al estado embrionario, presumiblemente por un proceso inverso a la diferenciación normal. Las manifestaciones fetales parecen ser la consecuencia de un mecanismo alterado de activación genética, que resulta en la represión de genes que se expresan normalmente y la desrepresión de genes que se hallan normalmente reprimidos en las células diferenciadas. Es decir: no es que no se hayan diferenciado los sistemas de una célula, sino que, una vez diferenciada, se han reprimido unos genes y activado otros, de tal manera que han devuelto a la célula tumoral algunas características propias del estado embrionario. En base a estas premisas, algunos autores han establecido que no se ha producido una interrupción de la ontogé-

nesis, sino un retorno a las (o algunas) características iniciales.

Los ejemplos son ya muy numerosos, pero yo quisiera seleccionar algunos especialmente vinculados al metabolismo hipóxico, por dos razones principales: a) porque la glucolisis aerobia es una característica de los tejidos tumorales, y b) porque al estudio del metabolismo hipóxico ha venido dedicando nuestro Laboratorio, desde hace

TABLA 2

Velocidad del flujo glucolítico en tejidos normales y neoplásicos de rata *

Tejido	Aerobiosis	Anaerobiosis
Normal		
Higado	< 1	2
Mucosa intestinal	1	3
Músculo	2	4
Riñón	6	4
Placenta	7	10
Cerebro	2	14
Embrión (total)	4	17
Retina	34	66
Tumor		
Hepatoma 5123-D·...	< 1	3
Hepatoma H-35·	< 1	2
Flexner-Jobling...	19	23
Sarcoma Jensen...	13	25

* Las velocidades se expresan en μmoles de lactato producido por gramo de tejido y por minuto en atmósfera de oxígeno o de nitrógeno.

· Tumores de desviación mínima

años, una particular atención. La glucolisis aerobia, con el efecto Pasteur que le es propio, constituye un despilfarro energético, pero se justifica plenamente en aquellos tejidos o en aquellos momentos metabólicos en los cuales interesa únicamente obtener energía, sin

preocuparse de la acabada utilización del esqueleto carbonado disponible. Este es el caso de la retina, de eritrocitos, del tejido neoplásico... y del momento del parto, en el cual se produce la degradación rapidísima de las reservas hidrocarbonadas, obteniéndose energía por vía glucolítica (tabla 2 (21)). Las concentraciones de ácido láctico llegan a alcanzar valores de 5,1 mM, frente a la concentración uno milimolar normal. En el momento de nacer, pueden soportarse hasta veinticinco-treinta minutos de anoxia, sin repercusiones patológicas, siempre que estos límites de excepcional holgura establecidos por la naturaleza no se sobrepasen. Si se prolongan estas situaciones, la concentración de algunos intermediarios sobrepasa los umbrales permitidos produciendo alteraciones en diversas células, cuando no la muerte por asfixia. Pero, en lo que se refiere a la lesión celular producida por concentraciones anormales de metabolitos, debe tenerse en cuenta el alto número de cambio de los hepatocitos, nefronas, etc., frente a la permanencia de la dotación neuronal inicial. Las neuronas no se renuevan y, en consecuencia, la lesión producida en el cerebro es permanente. Un estado transitorio de hipoxia superior a la admisible fisiológicamente puede conducir a retraso mental permanente.

Hace más de cincuenta años que Otto Warburg demostró que, en las células normales, la glucolisis, proceso esencialmente anaerobio, se inhibía por el oxígeno, efecto denominado Pasteur, en atención a haber sido el primer autor que puso de manifiesto que el oxígeno inhibía la fermentación alcohólica. Warburg observó que en los tejidos normales el efecto Pasteur conducía a la práctica inhibición de la glucolisis, mientras que en los tejidos tumorales la inhibición era sólo parcial, teniendo lugar una alta glucolisis aerobia (figura 4).

Warburg consideró esta incapacidad del efecto Pasteur para inhibir completamente la glucolisis como la manifestación de un desacoplamiento entre fermentación y respiración, que sería propio de las células cancerosas. Si bien es cierto que la hipótesis de Warburg constituye sin duda una simplificación excesiva de un complejísimo mecanismo de regulación metabólica, también es cierto que la alta glucolisis aerobia de la práctica totalidad de los tumores sigue cons-

tituyendo un objetivo y un reto para la investigación de la etiología oncológica.

Al considerar cuales son las razones que pueden explicar el efecto Pasteur y el desacoplamiento entre glucolisis y respiración, es lógico que la atención se centre en aquellas reacciones glucolíticas que

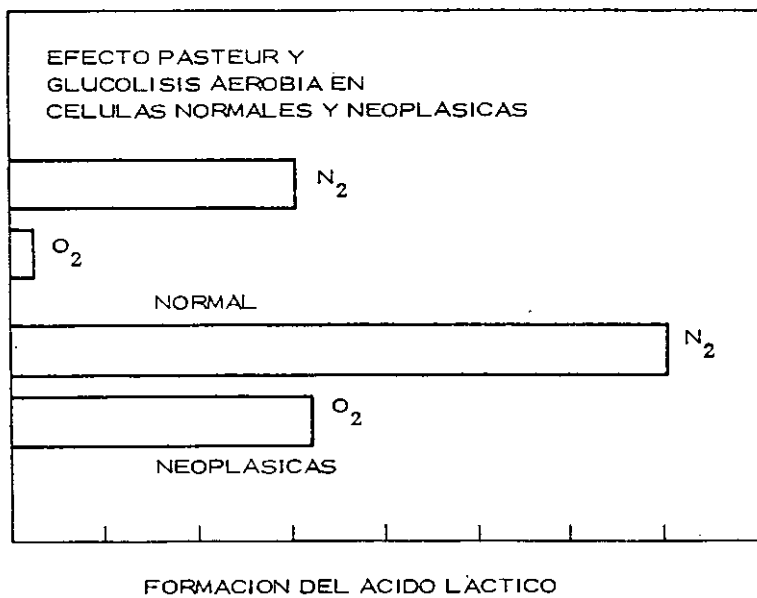

Fig. 4.—Efecto Pasteur y glucolisis aerobia en células normales y neoplásicas (Weinhouse y colab., 22).

pueden proporcionar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (ya que esta es la principal función de la respiración, que debe suplir la degradación glucolítica en los tejidos caracterizados por una alta glucolisis aerobia).

Weinhouse y colab. (22) han llamado la atención sobre la alta actividad de la piruvato cinasa I en los hepatomas poco diferenciados. Dada la extraordinaria significación de esta enzima en la elevada glucolisis aerobia de los tumores que, como acabamos de ver, es uno de los hechos más notables y controvertidos de la neoplasia, merece

detenernos nuevamente en la consideración de una forma de regulación isoenzimática.

Estos autores han examinado la posibilidad de explicar la alta

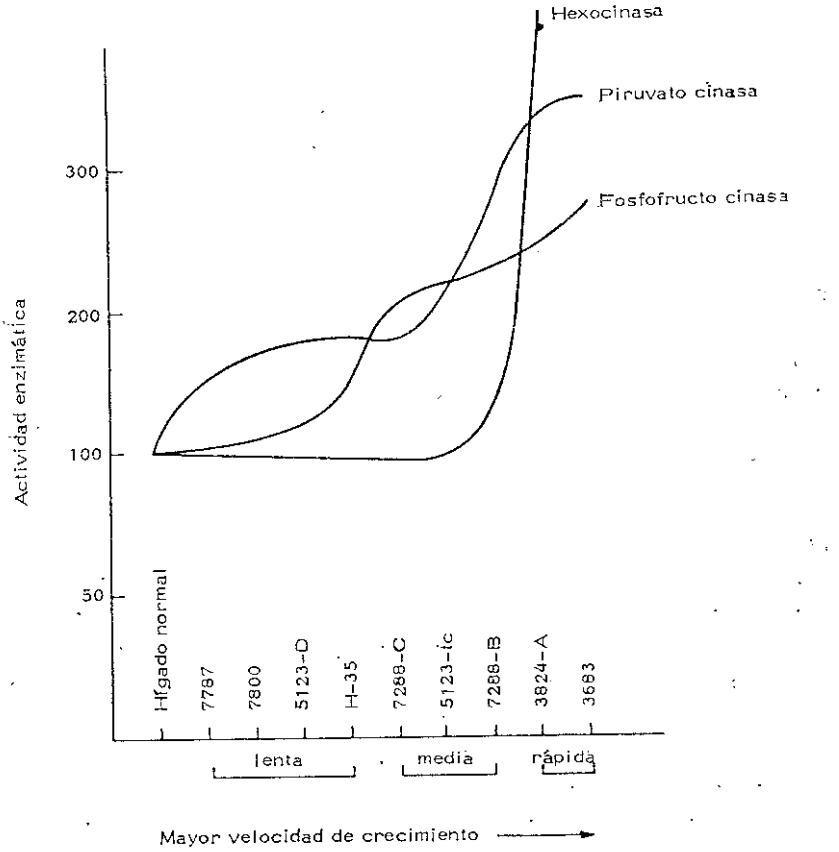

Fig 5.—Enzimas glucolíticos de algunos hepatomas de distinta velocidad de crecimiento. Las actividades enzimáticas se expresan en porcentajes de las del hígado normal (Weber, 1968; repr. de 21).

glucolisis de los hepatomas poco diferenciados suponiendo una alta capacidad competitiva de la *piruvato cinasa* en relación al ADP disponible. Esta posibilidad parecía fundamentarse en las dos razones siguientes: 1) los niveles totales de piruvato cinasa son de 5 a 10

veces mayores en los tumores poco diferenciados, caracterizados por una glucolisis muy alta, que en los tumores bien diferenciados, con una capacidad glucolítica sensiblemente menor (figura 5); 2) la piruvato cinasa presente en los tumores poco diferenciados difiere notablemente en sus propiedades cinéticas de la isoenzima típicamente hepática. Así, por ejemplo, la isoenzima hepática (II) se inhibe fuertemente por el ATP, de tal manera que es razonable esperar su inactivación en condiciones aerobias, en las cuales los niveles de ATP son altos. Contrariamente, la isoenzima de origen muscular (I) no se inhibe por el ATP, por lo cual puede actuar perfectamente en condiciones aeróbicas, en presencia de altas concentraciones de ATP. Desde la perspectiva de la indiferenciación, la presencia del isoenzima I se explica fácilmente: la lectura del genoma responsable de la isoenzima II todavía no se ha producido, manteniéndose reprimido o desactivado el sistema correspondiente. Desde la perspectiva de la desdiferenciación, puede explicarse por represión del gene-isoenzima II, con la simultánea activación o desinhibición del gene-isoenzima I.

Actualmente se conoce con cierto detalle la base molecular del efecto Pasteur (23). Incluye la integración de mecanismos de retrocontrol secuenciales, que tienen lugar preferentemente sobre la *fosfofructocinasa*. Esta enzima es inhibida alostéricamente por ATP, pero también por citrato, cuya utilización se halla controlada a su vez por la isocitrato deshidrogenasa-NAD, enzima asimismo alostérica, cuya activación depende de AMP en levadura y de ADP en las células animales. En circunstancias normales, al elevarse la concentración de ATP se inhibe la isocitrato deshidrogenasa-NAD dependiente, produciéndose un acúmulo de citrato. El citrato inhibe, junto con el ATP en aerobiosis, a la fosfofructocinasa. En anaerobiosis, se inhibe únicamente por ATP. La fosfofructocinasa se activa alostéricamente por AMP. Al inhibirse la fosfofructocinasa, se incrementan las concentraciones de glucosa 6-fosfato, lo que se traduce a su vez en una inhibición del transporte de glucosa. Del mismo modo que en la glucolisis aerobia se incrementa la piruvato cinasa no inhibida por altas concentraciones de ATP, se incrementa también la isoenzima fosfofructocinasa insensible a la inhibición por ATP. En efecto, Kurata y colaboradores (24) han hallado en hepatomas de crecimiento

rápido una clara diferencia con la composición isoenzimática del hígado normal. Disminuye la concentración de isoenzima IV y se eleva la concentración de isoenzima fosfofructocinasa II. Esta isoenzima, no regulable alostéricamente por altas concentraciones de ATP, es la que se halla en el hígado fetal. Todo sucede como si se hubiera desconectado la expresión del gene responsable de la proteína isoenzimática II.

No cabe duda de que la glucolisis aerobia constituye una expresión fenotípica de una etapa avanzada en el proceso de desdiferenciación de las células cancerosas. Son múltiples los ejemplos de isoenzimas no regulables que aparecen en los tejidos caracterizados por una alta glucolisis aerobia.

Otros ejemplos de enzimas que se hallan presentes en hepatomas, si bien están ausentes en el hígado adulto, son:

Glutaminasa: en el adulto, la glutaminasa hepática activa es P-dependiente, mientras que la enzima de cerebro y riñón es P-independiente. Sin embargo, la actividad glutaminásica de los hepatomas y del hígado fetal corre a cargo, exclusivamente, de la isoenzima P-independiente.

Lo mismo sucede con la *amidotransferasa*, responsable de la síntesis de glucosamina-6-fosfato, necesaria para la síntesis de los heteropolisacáridos de las membranas. La forma presente en los hepatomas e hígado fetal es la isoenzima *no* regulable.

Schapira y Hatzfeld (25) han corroborado la presencia de formas moleculares «fetales» de algunas enzimas en los tejidos cancerosos, centrando su atención en las aldolasas en el hepatoma. La *aldolasa* A (isoenzima muscular), relativamente abundante en el hígado fetal, y que se halla presente en muy pequeña cantidad en el hígado adulto normal, se eleva —«resucita» dicen los autores— en el hepatoma. Mediante electroforesis sobre gel de almidón demostraron que la aldolasa A adoptaba formas híbridas con la aldolasa B, forma normal en el hígado adulto. En los hepatomas de crecimiento rápido, la aldolasa B desaparece prácticamente, mientras que la aldolasa A se halla presente en grandes cantidades. Por otra parte, se ha observado la presencia de aldolasa C (característica del cerebro), totalmente ausente en el hígado adulto normal, entre otros procedimientos de menor especificidad, mediante antisuero específico «antialdolasa C».

El espectro enzimático fetal no es específico de la carcinogénesis: en algunos casos, se han encontrado diversas enzimas musculares de tipo fetal en atrofias y distrofias musculares. Puede concluirse que en algunas situaciones patológicas la biosíntesis de las formas adultas de enzimas se hallan reprimidas, mientras que las formas fetales —formas moleculares menos diferenciadas— se hallan desreprimidas.

Pero volvamos al estudio de las aldolasas. La diferencia fundamental entre los tres tipos de aldolasas A, B y C lo constituye la actividad relativa que demuestran para la fructosa-1-fosfato. En efecto, la relación de actividad aldolásica frente a la fructosa-1-6-difosfato y la fructosa-1-fosfato es superior a 50 en el caso de la aldolasa A, de tipo muscular; igual a 1 para la aldolasa B, de tipo hepático y tiene un valor de 5 a 10, según las especies, en el caso de la aldolasa C, tipo cerebral. Dichas isoenzimas se distribuyen según la especie, el tejido y la edad. Así, el músculo contiene de forma prácticamente única aldolasa A: el hígado contiene casi exclusivamente aldolasa B: el cerebro contiene las dos aldolasas A y C hibridadas. Como resultado de la hibridación entre los tipos A y C se originan cinco isoenzimas: A_4, A_3 C_1, A_2 C_2, A_1 C_3 y C_4, debido a que las aldolasas son moléculas tetraméricas (14). También la hibridación entre los tipos A y B forma cinco isoenzimas. Se ha conseguido la hibridación «in vitro» de los tipos B y C, a pesar de que no se han hallado representantes en la naturaleza de estas formas híbridas, ni siquiera en las aves donde el tipo C se halla más extendido.

En el hígado fetal se hallan presentes las tres aldolasas, encontrándose la aldolasa B hibridada con la aldolasa A. Se han detectado diversas isoenzimas con una emigración anódica parecida a las isoenzimas de la aldolasa de cerebro. ¿Estas formas —se preguntan Schapira y Hatzfeld— son sintetizadas por las mismas células que sintetizan la forma normal adulta? La respuesta parece afirmativa en el caso de la aldolasa A, debido a la presencia de formas híbridas entre los tipos A y B. No puede decirse lo mismo para la forma C, ya que los híbridos B-C no han sido hallados en la naturaleza. Por otra parte, en hígado en regeneración después de una hepatectomía parcial, se observa un ligero aumento de la aldolasa tipo A, sin que se produzca resurgimiento alguno de la aldolasa tipo C.

También en el caso de la *láctico deshidrogenasa*, se ha observado un claro aumento de las subunidades propias de la enzima de corazón en los hepatomas experimentales. Como ya se ha indicado, se conocen cinco isoenzimas, resultantes de la combinación, en tetrámeros activos, de las unidades A y B. El monómero A predomina en la lactato deshidrogenasa del hígado fetal, mientras que la integrada por el monómero B, más regulable, predomina en el hígado adulto. Asimismo, la diferenciación del cerebro conlleva un cambio desde formas en las que predomina el monómero A a aquéllas en el que predomina el monómero B, es decir, las formas que permiten pasar de un metabolismo más anaerobio a otro más aerobio (26).

La forma A4, denominada asimismo lactato deshidrogenasa tipo 5, es la muscular, no regulable, que predomina en el tejido neoplásico. Es la síntesis enzimática la que se ha modificado reprimiendo los sistemas que conducen a la síntesis del monómero B, y favoreciendo la expresión de los genomas responsables de la aparición del monómero A. En efecto, la LDH tipo 5 no se inhibe por exceso de sustrato y es apropiada, por tanto, para funcionar en las condiciones propias de una alta fermentación o glucolisis. En cambio, la forma 1, integrada exclusivamente por el monómero B, se inhibe fuertemente por exceso de sustrato. Sin embargo, debemos puntualizar que no todo es tan sencillo y que es imprescindible, a los efectos de la repercusión fisiopatológica y en la extracción de conclusiones, conocer si las concentraciones que producen inhibición en los sistemas aislados pueden hallarse realmente «in vivo». Wuntch y colab. (27) han puntualizado, en relación a las láctico deshidrogenasas, que son muchos los factores que pueden influir sobre su actividad y que se requiere un estudio más detallado para poder explicar algunas incoherencias con el sencillo esquema anteriormente apuntado, tales como el hecho de que en el hígado, esencialmente aerobio, exista casi exclusivamente la LDH-A4, mientras que en los eritrocitos, anaerobios, se halle principalmente la forma B4. Por otra parte, según dichos autores, en las concentraciones fisiológicas de piruvato no hay diferencias en las respuestas que ofrecen los monómeros A y B. La forma B es sensible a altas concentraciones de piruvato sólo a bajas temperaturas, pero no parece haber serias diferencias en las temperaturas fisiológicas.

Existen tres *creatina-cinasas* activas, procedentes de dos locus genéticos diferentes, que transcriben dos polipéptidos de composición distinta, M y B. Estos monómeros, como hemos visto, pueden dar lugar a dímeros activos homólogos (MM y BB) o heterólogos (MB). También son los dímeros menos regulables los que se hallan presentes en tejidos neoplásicos, razón por la cual Schapira (25) ha concluido que «en algunos estados patológicos (carcinogénesis, músculo distrófico, etc.) la biosíntesis de la forma adulta de las enzimas está preferentemente reprimida mientras que la forma fetal —o forma molecular menos diferenciada— estaría desreprimida».

Asimismo las formas musculares de glucógeno sintetasa, fructosa-1,6-difosfatasa y glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, ausentes en el hígado adulto, se hallan presentes en hepatomas. También las transferasas de aminoácidos con cadena ramificada aportan nuevos datos sobre este «resurgimiento» de las formas moleculares enzimáticas propias del feto en tejidos neoplásicos.

En resumen, se trata de la expresión fenotípica de una desdiferenciación en los tejidos neoplásicos que los equipararía a los tejidos embrionarios, todavía no diferenciados. En el caso de los tejidos tumorales. tendría lugar una simultánea reactivación de genes presumiblemente reprimidos. Las isoenzimas altamente reguladas propias de los tejidos adultos son sustituidas en sus funciones por formas isoenzimáticas no reguladas por el contexto metabólico pero susceptibles de cumplir eficientemente su función. Weinhouse (22) opina que la brillante frase de Potter «la oncogenia es la interpretación de la ontogenia» no refleja exactamente la situación: todo parece indicar, en efecto, que las manifestaciones embrionarias de las células tumorales son la consecuencia de un mecanismo de activación genética desordenado, que produce la represión de genes normalmente activos y la derepresión de genes que se hallan normalmente reprimidos en las células diferenciadas.

Podemos concluir diciendo que las isoenzimas constituyen un hecho fundamental en la organización bioquímica de los seres vivos y representan una nueva dimensión de la enzimología. Desde 1959 en que fueron identificadas las primeras formas isoenzimáticas, varios centenares de enzimas han sido descompuestas en múltiples formas moleculares y la multiplicidad isoenzimática se ha convertido en

una de las formas de regulación más importantes (28). En efecto, las isoenzimas permiten evaluar el grado de polimorfismo genético presente en poblaciones, las diferencias genéticas dentro y entre las especies, la expresión genética diferencial que tiene lugar durante el desarrollo, la correlación entre el funcionamiento de los genes y la estructura y función enzimática, la complementariedad y heterosis intra e intergénica, así como la evolución de genes y de organismos.

Como acabamos de ver, la capacidad de perder o ganar características específicas bioquímicas es un hecho común del desarrollo celular y la diferenciación. Diversos cambios cualitativos y cuantitativos en la actividad de las proteínas (enzimas) constituyen los principales fenómenos del ciclo vital de la mayoría de los organismos. La aparición de una menor actividad enzimática o el incremento de la misma en un organismo en desarrollo puede ser la consecuencia de la síntesis «de novo» de una molécula enzimática o de la activación de precursores enzimáticos preexistentes. La proteolisis parcial como mecanismo iniciador de muchas funciones fisiológicas en el organismo ha sido recientemente estudiada por Neurath y col. (29). La conversión de precursores a formas activas no sólo tiene importancia en las enzimas digestivas, sino en los fenómenos de autoagregación como en el procolágeno, fibrinógeno, etc., y en la producción de hormonas a partir de precursores (proinsulina, angiotensinógeno, etcétera).

Por otra parte, muy recientemente, Levitzki (30) ha revisado con especial detalle las interacciones de las subunidades y los modelos moleculares de efectos cooperativos. Estas interacciones, progresivamente complejas, permiten un mejor conocimiento de las bases moleculares de la regulación enzimática, así como aquellos procesos que comportan cambios de esta naturaleza en el cumplimiento de su función, tales como las interacciones que tienen lugar entre los receptores de acetilcolina y las drogas, hormonas y adenilciclasa, etc.

Aunque no se conocen todavía los mecanismos exactos mediante los cuales los organismos superiores regulan la expresión diferencial de macromoléculas, no cabe duda de que estos cambios requieren regulación a nivel genético y/o en los pasos que median entre el gene y el producto final, es decir, la enzima activa. En consecuencia, las isoenzimas son una expresión de la diferenciación de las cé-

lulas, de tal modo que el análisis detallado de sus aspectos enzimáticos en cada momento y de sus propiedades durante el desarrollo, pueden conducir a unos conocimientos del mayor interés para la comprensión de los mecanismos básicos genéticos y metabólicos que configuran la diferenciación celular (31).

Hemoglobinopatías. Las talasemias como modelo molecular

Las hemoglobinopatías han sido extensamente tratadas en recientes revisiones (14). También la evolución de las secuencias monopeptídicas de la hemoglobina en vertebrados ha sido revisada recientemente por Goodman y col. (32). Con estas referencias, vamos a centrar nuestra atención en las talasemias, que pueden orientarnos perfectamente para considerar a nivel molecular cuanto acabamos de decir. En efecto, la fácil disponibilidad de la sangre, como tejido circulante, ha permitido conocer con especial detalle las características de los polipéptidos que forman parte del tetrámero activo de la hemoglobina. Como es bien sabido, la hemoglobina se halla integrada por dos cadenas α y dos cadenas β, cuya secuencia monopeptídica está bien establecida. Las cadenas α tienen 141 aminoácidos mientras que las β se hallan integradas por 146 aminoácidos. La hemoglobina adulta cumple su papel de transoxigenación gracias a un fenómeno de activación cooperativa, por interacción entre las moléculas que constituyen el tetrámero. El difosfoglicerato, al unirse a la molécula de hemoglobina adulta, permite la mejor liberación del oxígeno a bajas presiones de oxígeno, con el fin de facilitar la transferencia del oxígeno eritrocítico al mioglobínico, es decir, a la célula. La hemoglobina fetal se halla compuesta por dos cadenas α y dos cadenas γ. Las cadenas γ constan también, al igual que las β, de 146 aminoácidos, pero existen 35 diferencias en la secuencia. Como vemos, la única diferencia entre la hemoglobina fetal y la adulta es la inhibición, en un momento dado, de la síntesis de cadenas polipeptídicas γ, con la simultánea activación o desinhibición, a nivel cistrónico, del sistema productor de las cadenas β. La ontogenia de las cadenas de la hemoglobina se ilustra perfectamente en la figura 6.

En las talasemias se siguen produciendo cadenas γ: es decir, no

ha funcionado el sistema que pone en marcha la producción de cadenas β e inhibe la de cadenas γ. El abanico de gravedad de las talasemias o, en otras palabras, el de la persistencia de formas fetales de hemoglobina en el adulto es muy variado, como corresponde al polimorfismo genético que existe también en la producción de cadenas γ. En la sangre umbilical normal se considera que existen en relación

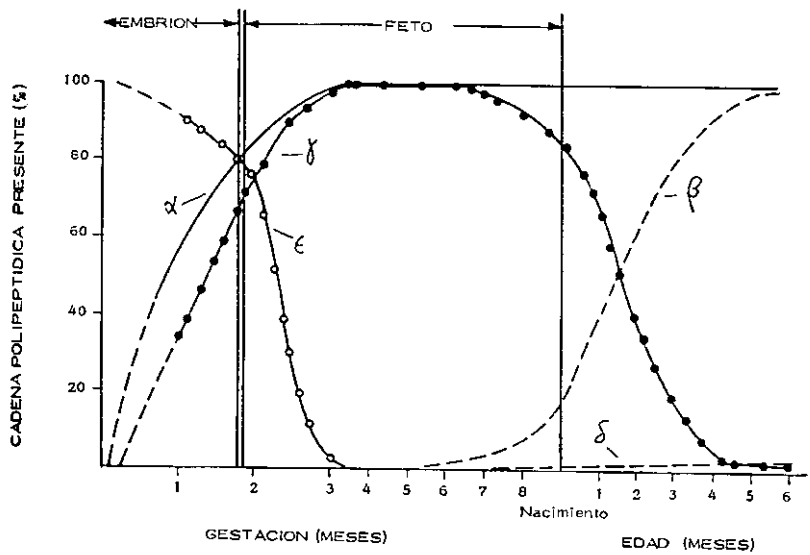

Fig. 6.—Ontogenia de las cadenas de hemoglobina humana (33).

3 a 1 cadenas G γ, con glicocola en la posición 136 y cadena A γ con alanina en dicha posición. De acuerdo con Hollan y col. (34), «sean cuales sean los factores implicados en el control, la represión de dos o más de los genes estructurales de la cadena β va acompañada de la desrepresión o inducción de los genes estructurales de las cadenas G γ y A γ. El hallazgo de una relación G γ/A γ de tipo fetal en adultos con altos niveles de hemoglobina F es extraordinariamente interesante. El incremento de producción de G γ puede relacionarse con el incremento de un tipo fetal de hemoglobina en carneros y cabras como respuesta a pérdidas agudas de sangre o a la administración de agentes eritropoyéticos. Estas observaciones sugieren que determinados factores hormonales producidos en los animales ané-

micos son capaces de estimular genes estructurales «durmientes»... La reactivación de la producción de proteínas tipo fetal es de gran interés si se parte de la base de que la oncogenia es un defecto de la ontogenia». En realidad, depende de la etapa del proceso de diferenciación que se considere interrumpida: en células muy diferenciadas es un regreso, no una interrupción. De hecho, se conocen talasemias por:

1) Retraso en la desaparición de las cadenas.

2) Reaparición de las cadenas γ, cuya producción ya se hallaba interrumpida.

Como ejemplos de la primera podemos citar la drepanocitosis homocigótica, las deta-talasemias, la persistencia hereditaria de hemoglobina F, algunas trisomías, anemias aplásticas congénitas (enfermedades de Fanconi...) Como ejemplos de las segundas, anemias aplásticas adquiridas, leucosis y otras anemias propias de enfermedades malignas, anemias megaloblásticas, algunas tirotoxicosis, etcétera. En este caso, junto a la elevación de hemoglobina fetal se han encontrado, en algunos fenotipos pleiotrópicos, modificaciones enzimáticas en las actividades de la piruvatocinasa, hexocinasa, fosfofructocinasa, etc.

La reaparición de hemoglobina fetal con una relación 3/1 de G γ/A γ puede explicarse por un despertar de células fetales durmientes (mecanismo clonal) o por desrepresión de los genes que producen la hemoglobina F. Sin embargo, cuando se observa la aparición de relaciones 2/3, propia de la hemoglobina fetal del adulto, no es más que un incremento de una expresión genética poco activa.

Kabat y Koler (34) han actualizado los conocimientos sobre las talasemias que, junto con las hemoglobinopatías, han permitido conocer con todo detalle la influencia que tiene en la disposición espacial la variación de un solo aminoácido. En efecto, basta con que se sustituya un aminoácido monoaminodicarboxílico por otro aminoácido apolar, como sucede en el caso de las anemias falciformes, para que la estructura cuaternaria resultante sea inhábil para el ejercicio de la función transoxigenante que le es propia.

En fechas recientes, se ha profundizado en la estructura molecular de algunas enzimas de gran significación dentro del capítulo de los errores congénitos, pudiéndose concluir que, al igual que sucede

en el caso de las homoglobinopatías, se produce una proteína catalíticamente inactiva por haberse producido una levísima alteración a nivel genético que conduce a una secuencia de aminoácidos con un ligerísimo cambio, prácticamente imperceptible, pero que es suficiente para que las zonas activas de la molécula enzimática no sean ya capaces, al haberse modificado su disposición espacial, de acoplarse debidamente con el sustrato y activadores o inhibidores. Este es el caso de la galactosa-1-fosfato uridil transferasa, purificada recientemente por Dale y Popják (35) a partir de eritrocitos humanos. La enzima se halla formada por dos subunidades idénticas de un peso molecular de 31.000. Los métodos utilizados para la purificación de la transferasa a partir de glóbulos rojos normales se aplicaron con éxito para el aislamiento de una proteína catalíticamente inactiva a partir de los eritrocitos de un enfermo galactosémico. La enzima inactiva mostraba una identidad inmunológica total con la transferasa normal. Realizadas las investigaciones de secuencia monopeptídica, se concluye que, como era previsible, la galactosemia consiste en una mutación en un gene estructural que produce la sustitución de un aminoácido por otro posiblemente localizado cerca de la zona catalítica, sin que se adviertan cambios apreciables en la composición monopeptídica ni en el comportamiento inmunológico.

En el mismo sentido, Cotton y Danks (36) han aplicado el procedimiento de purificación de la fenilalanina hidroxilasa a un paciente fenilcetonúrico fallecido a los quince años (por una causa totalmente ajena a la enzimopatía), encontrando que de las dos fracciones proteicas que integran la fenilalanina hidroxilasa activa, sólo una, la de menor velocidad, se halla presente en el hígado del enfermo. La otra fracción, debido a la diferencia estructural propia de la alteración genética correspondiente, no será capaz de unirse a esta subunidad o bien será más sensible a la degradación post-mortem o bien no será retenida por el procedimiento de purificación en columna, en las condiciones experimentales, por diferir mucho en sus propiedades de la fracción proteica que integra la fenilalanina hidroxilasa normal.

Enzimopatías

Las enzimopatías genéticas se traducen casi siempre por una pérdida de actividad, que puede ser debida a que la molécula de origen no se produce o se produce en cantidad insuficiente, o bien que la molécula producida se halla alterada y no es funcional. En este último caso se trata necesariamente de una modificación de la naturaleza enzimática; en el primero puede tratarse de una anomalía de la naturaleza (enzima inviable) o de una anomalía de regulación. Algunas anomalías, en efecto, se centran sobre el gene regulador o los mecanismos de regulación, produciéndose una proteína totalmente normal, pero con el sistema de modulación alterado. Sin embargo, la mayor parte de las enzimopatías presentan alteraciones en los genes estructurales y, en consecuencia, las proteínas resultantes son totalmente incapaces o menos efectivas que las normales en la realización de una determinada actividad.

Lógicamente, existe un gradiente de inhabilidad para realizar la labor catalítica, según sea esencial o no para la acción enzimática el punto «lesionado». Una de las mutantes enzimáticas puede tener, por ejemplo, notablemente reducida la afinidad por el sustrato. Así, Tedesco y Mallman (37) informaron que los fibrobastos cultivados de un paciente con citrulinemia eran capaces de convertir la citrulina en ácido arginín-succínico, pero que la enzima responsable de la reacción, la arginín-succínico sintetasa, tenía una afinidad por el sustrato mucho mayor en las células normales que en las células procedentes del paciente. En otros casos, la enzima mutante se une a los cofactores necesarios para la reacción anormalmente. También cita Rosemberg (4) que Frimpter demostró que la actividad de la cistationasa en homogenados de hígado procedente de pacientes con cistationuria se incrementaba notablemente «in vitro» cuando se añadía piridoxal fosfato al medio de incubación. Estos resultados sugirieron que la mutación en la cistationuria altera la zona de la proteína enzimática que une al coenzima, de tal manera que la actividad enzimática puede restablecerse a niveles prácticamente normales en presencia de altas concentraciones de coenzima. Esta observación condujo al tratamiento aplicado a los casos de cistationuria: la excre-

ción de cistationina en pacientes cistationúricos disminuye significativamente mediante la administración de altas dosis de piridoxina.

Por otra parte, la enzima mutante puede ser menos estable o tener una velocidad de destrucción mayor. Existe, por último, otro mecanismo que reduce la actividad catalítica: es el que afecta a la interacción entre las subunidades que constituyen la proteína activa. Las mutaciones pueden afectar a las subunidades polipeptídicas de tal manera que su agregación en holoenzimas funcionales no pueda producirse. Ya hemos indicado antes que si bien lo normal es que una alteración patológica se origine por la ausencia o actividad reducida de una enzima, puede también darse el caso contrario, es decir el de la síntesis indiscriminada de un sistema enzimático, como sucede en la porfiria aguda intermitente, debido a la producción de una mutación en el gene controlador. Asimismo, debe destacarse que es concebible que una mutación puntual en un gene estructural conduzca a la síntesis de una enzima que tenga una mayor afinidad por su sustrato, o una mayor vida media. Este exceso de actividad enzimática, en lugar del defecto que constituye normalmente la razón de estos estudios, constituye un campo de investigación enormemente sugestivo.

Existen modificaciones fenotípicas que no son el resultado de una alteración en el genotipo. La mayoría de ellas se deben a modificaciones del entorno que afectan gravemente al fenotipo: uno de los mejores ejemplos es el de los niños genotípicamente no fenilcetonúricos que nacen, sin embargo, con un profundo retraso mental al haberse desarrollado en el seno de una madre fenilcetonúrica. En efecto, la hiperfenilalaninemia intrauterina ha interferido el normal desarrollo cerebral en el feto. En cambio, cuando es el genotipo el que se halla alterado, el medio intrauterino es normal y el fenotipo aparece modificado únicamente después del nacimiento, cuando se pone de manifiesto la incapacidad genética para la asimilación de la fenilalanina, por carencia de la fenilalanina hidroxilasa.

Las enfermedades propias del metabolismo hidrocarbonado, del metabolismo lipídico, incluyendo las importantes esfingolipodistrofias, las del metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos nucleicos, han sido ampliamente tratadas y recogidas en los últimos años, en diversas publicaciones (1, 3, 5, 38-41). En todas ellas se ha puesto

de manifiesto, al conocerse mejor la estructura de las cadenas polipeptídicas que integran la proteína activa, que las más pequeñas modificaciones en dicha estructura, al modificarse tan solo una base del triplete codificador, conducen a una inhabilidad total o parcial para ejercer las diversas actividades enzimáticas propias del metabolismo celular.

La *clasificación* de estas enfermedades, de acuerdo con las reacciones enzimáticas alteradas, según pertenezcan a glúcidos, lípidos, prótidos o ácidos nucleicos, no tiene otro valor que el de una ordenación lógica de las mismas. Pero esta ordenación no debe hacernos perder de vista la íntima interconexión que existe en el organismo entre el metabolismo de los lípidos, de los prótidos, de los glúcidos y de los ácidos nucleicos. Es más, si profundizamos en el conocimiento de la síntesis proteica y de los factores que la regulan, tanto en el citosol como intramitocondrialmente, nos daremos cuenta de que las relaciones entre estructura y función, entre los distintos compartimentos celulares y entre las reacciones características del metabolismo de los principales componentes orgánicos constituyen un conjunto plenamente armónico, de tal modo que la disonancia en uno de ellos, sea cual sea su situación o composición, repercute fuertemente en el conjunto. Unicamente podemos considerar como excepciones aquellos casos en que un determinado órgano posea unas capacidades diferenciales que permitan, dentro de un ser superior, que lo que por su cualidad o su cuantía sería nocivo y patológico en un órgano, sea normal y fisiológico, al menos en determinados momentos del desarrollo, en otro órgano del mismo individuo. Son precisamente estas diferencias en el funcionamiento de distintos órganos del hombre lo que permite abordar el estudio de alteraciones moleculares que cursan con profundo retraso mental, debido a *las características peculiares del cerebro* y, principalmente, a la no renovación de las células encargadas de la transmisión nerviosa. Las neuronas no se renuevan. El cerebro posee unas capacidades específicas, al menos en algunos períodos iniciales de su desarrollo: así, por ejemplo, es capaz de metabolizar —gracias a la presencia de actividades enzimáticas diferenciales— compuestos producidos en el hígado, pero que no puede utilizar como fuente energética.

Como vemos, los efectos estructurales son permanentes, los efec-

tos funcionales reversibles. Su patogénesis es muy distinta: en un caso, el acúmulo de una sustancia produce un daño en el cerebro no recuperable, mientras que en el otro existen mecanismos para soslayar, al menos durante algún tiempo, el defecto funcional producido. Sin embargo, como han puesto de manifiesto Gaull y col. (42), algunos efectos funcionales reversibles pueden convertirse en defectos estructurales permanentes cuando se repiten, especialmente si el intervalo entre los mismos no da tiempo para la recuperación. Por otra parte, el momento en que se produce el efecto es crucial, ya que la posibilidad de defectos estructurales se incrementa a medida que nos acercamos al momento del nacimiento o del máximo desarrollo, dado que en este momento la relación entre estructura y actividad es mayor.

En efecto, el gradiente de mayor a menor gravedad en la expresión de los errores metabólicos congénitos depende de que la actividad deficitaria se necesite de manera continuada o eventual, según el sustrato constituya o no algo normalmente presente en el medio. Así, se conocen enzimopatías asintomáticas con escasas consecuencias patológicas, ya que cuando ocasionalmente se ponen de manifiesto, por no ser circunstancia habitual en nuestro entorno, no origina grandes trastornos (es el caso de muchas fructosurias, de la β-aminoisibutiricoaciduria, etc.). Sin embargo, hay otras que son también asintomáticas, pero que cuando se presentan pueden tener importancia patológica: el caso más frecuente es el de las alteraciones farmacogenéticas. En ocasiones, las enfermedades congénitas producen trastornos y síntomas que son compatibles con una vida larga y normal (es el caso de la acatalasia, enzimopatía benigna en ausencia de infecciones nasofaríngeas, o la bilirrubinemia familiar, o la alcaptonuria, etc.). Sin embargo, en otras enfermedades se producen cambios irreversibles en el sistema nervioso central. Es el caso de muchas lipidosis, aminoacidopatías, etc. La aparición de los síntomas clínicos depende del momento y de la intensidad con que actúa el entorno desfavorable frente al organismo deficitario: así, por ejemplo, la galactosemia se presenta muy rápidamente, mientras que otras enfermedades aparecen con menor precocidad y sus consecuencias son también menores, ya que no inciden (como sucede en las lipidosis, galactosemia, fenilpiruvia, etc.) en el momento en que se está reali-

zando la mielinización y mayor desarrollo del cerebro. Debe tenerse en cuenta que la mitad del crecimiento total del cerebro humano tiene lugar durante los seis primeros meses de vida (43).

Es altamente posible que los efectos nocivos de un exceso de fenilalanina, galactosa o aminoácidos ramificados o cetoácidos en el cerebro se hallen limitados a los primeros meses de vida cuando el desarrollo y organización del cerebro tienen lugar a una velocidad extraordinaria, que después prácticamente se estabiliza. Hasta el punto de que la terapéutica y prevención consiste, en este caso, en dosificar perfectamente la ingesta de estos productos hasta una determinada edad, momento en que ya puede prescindirse totalmente o casi totalmente de la restricción dietética.

En una reciente publicación —«Brain damage and perinatal biochemistry» (44)— me he referido con detalle a las circunstancias que propician una lesión irreversible, deteniéndome especialmente en la hipoxia, a cuyo estudio metabólico básico ha dedicado especial atención, como antes he indicado, nuestro Departamento (45-47).

El origen de la subnormalidad psíquica puede expresarse, a grandes rasgos, como sigue:

	%
Anoxia y trauma de parto	34
Mongólicos	22
De etiología desconocida	26
Otras causas	18

Es indudable, pues, que la gravedad depende de manera directa, en muchos casos, del estado de la neurogénesis posnatal (48). Las observaciones del momento en que aparecen algunos trastornos han proporcionado muchos datos de interés sobre la enzimogénesis. Recíprocamente, las investigaciones realizadas sobre el momento en que las enzimas se forman o activan y su dependencia de las condiciones propias del organismo en dicho momento contribuirán a un tratamiento racional de las alteraciones que se producen en los primeros días de la vida posnatal (49).

ALGUNOS EJEMPLOS DE ESPECIAL INTERÉS

1. *Aminoacidopatías*

Las alteraciones del metabolismo de los aminoácidos, así como la más moderna metodología para su diagnóstico precoz, han sido descritas recientemente en el libro editado por Nyhan (5). También Gaull y col. (42) acaban de publicar una extensa revisión de la patogénesis de la disfunción cerebral en las aminoacidopatías. A pesar del acúmulo de información sobre el tema (etiología genética, neurobiología, etc.) no se han podido establecer claras relaciones entre los defectos enzimáticos observados y el déficit neurológico que se produce.

En nuestro Departamento se han configurado desde hace algún tiempo algunas líneas de trabajo para intentar contribuir a esclarecer la patogénesis de algunas enzimopatías y, en particular, la de la fenilcetonuria (50-56). ¿Por qué el incremento de fenilalanina produce una disfunción cerebral irreversible? Está fuera de toda duda que un individuo fenilcetonúrico es mentalmente normal en el momento de nacer y que la progresiva pérdida de inteligencia tiene lugar durante los primeros meses y años de su vida, especialmente en los períodos en los que el proceso de mielinización es más activo. Se conoce que en los pacientes con fenilcetonuria no tratada dietéticamente desde el principio, existen evidentes trastornos en la mielinización. Dado que los complejos proteína-colesterol-fosfolípidos son los precursores de la mielina, su formación puede ser interrumpida bien sea por algún defecto en la síntesis proteica o por defectos en la síntesis de alguno de los otros componentes citados. El efecto de la fenilalanina sobre la formación de mielina se está estudiando en ratas con fenilcetonuria inducida experimentalmente. Las concentraciones de fenilalanina en sangre y cerebro de ratas con fenilcetonuria inducida son similares a las halladas en los tejidos de los pacientes fenilcetonúricos. Tanto en los animales de experimentación como en los pacientes fenilcetonúricos, las altas concentraciones de fenilalanina en sangre y tejidos producen una considerable disminución en la concentración de otros aminoácidos proteinogenéticos. Esta disminu-

ción puede hallarse relacionada con la inhibición del transporte de aminoácidos al cerebro, ya que la fenilalanina inhibe el transporte de varios aminoácidos. Esta acción obstaculizadora del acceso de aminoácidos al cerebro puede ser un factor importante en la etiología de la disfunción cerebral en la fenilcetonuria, ya que la síntesis proteica cerebral depende, lógicamente, de la existencia de aminoácidos libres en las concentraciones adecuadas (57).

También se ha comprobado que la fenilalanina en altas concentraciones inhibe la glucolisis cerebral, a nivel de la piruvato cinasa. Por otra parte, se observan disminuciones en las concentraciones de glucosa-6-fosfato y de fructosa-6-fosfato, que pueden deberse tanto a la inhibición de la actividad de la hexocinasa por el fenilpiruvato como por alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular a la glucosa. En cualquier caso, la inhibición de la glucolisis cerebral por la fenilalanina puede ser otro factor a considerar en la etiología del retraso mental, ya que disminuiría la cantidad de acetil-CoA requerido para el aporte energético y la síntesis lipídica.

Por último, otra línea de trabajo estudia con detenimiento los cuerpos cetónicos y su utilización por el cerebro (53, 54). El metabolismo de los cuerpos cetónicos en el cerebro, no sólo tiene una finalidad energética sino la de procurar un aporte muy alto del acetil-CoA requerido para la síntesis de lípidos necesarios para el proceso de mielinización. Existe una clara coincidencia entre el momento de máximo metabolismo de cuerpos cetónicos con la mielinización, de tal manera que la inhibición por fenilalanina o sus derivados de las enzimas implicadas en la utilización de los cuerpos cetónicos puede constituir otro factor a tener en cuenta en la patogénesis de la fenilcetonuria.

El efecto inhibidor de la alanina, cisteína y fenilalanina sobre las isoenzimas de piruvato cinasas reguladoras fue puesto de manifiesto por Sols y col. (58). Conviene conocer ahora cuál es la sensibilidad de las formas isoenzimáticas neonatales a dichos aminoácidos, en concentraciones tanto fisiológicas como patológicas.

Utilizando cultivos «in vitro» de medula espinal de ratón, Sprinkle y Rennert (59) han demostrado que la fenilalanina y el fenilpiruvato inhiben la síntesis de los sulfátidos (galactocerebrósidos), que se forman durante el desarrollo posnatal del cerebro en el ratón. El

fenil-lactato y fenilacetato no presentan acción. Estos resultados han sido confirmados, al parecer, mediante inyección intracerebral de los metabolitos indicados. También el ácido α-ceto-isocaproico inhibía fuertemente las síntesis de sulfátidos, sugiriendo que la enfermedad «orina con olor a jarabe de arce» puede basarse, asimismo, en una clara interferencia de la mielinización en el cerebro en desarrollo.

Por otra parte, la concentración de aminoácidos *normales* en cantidades mayores a las habituales o en localizaciones distintas a aquellas en las que cumplen normalmente su cometido biológico, puede producir clarísimos efectos neurotóxicos. Tal es el caso de los efectos tóxicos del glutamato y de la cisteína sobre el sistema nervioso central en su fase de desarrollo (60). En algunos enfermos que presentaron un profundo retraso mental, se hallaron altas concentraciones de ácido glutámico en el líquido cefaloraquídeo, a pesar de que la concentración hemática era sólo moderadamente elevada (61). Al parecer, se trata de una alteración congénita en la cual en el sistema nervioso central se producen cantidades anormalmente altas de glutamato extracelular. Como indica Olney (60) debe tenerse muy en cuenta que en estos casos patológicos se investigó y halló la existencia de una alta concentración de glutamato en el líquido cefaloraquídeo debido a la extrema gravedad de la sintomatología de los pacientes. Sin embargo, condiciones más suaves en las cuales existan cambios mucho menos evidentes en el contenido de glutamato u otros aminoácidos excitotóxicos, únicamente podrán ponerse de manifiesto si se inicia el estudio de las concentraciones de componentes anormales no sólo en sangre sino en el líquido cefaloraquídeo.

El mismo autor pone de manifiesto que la l-cisteína presenta un clarísimo efecto tóxico sobre el sistema nervioso central, así como algunos de sus derivados. A este respecto debe tenerse en cuenta que la homocistinuria, el error congénito del metabolismo monopeptídico más frecuente después de la fenilcetonuria, se caracteriza por el incremento en sangre de homocistina, de evidentes efectos neurotóxicos.

Debe hacerse un especial énfasis en la consideración de *los sistemas de transporte*, de su presencia, de su calidad, de su selectividad en los distintos momentos de la diferenciación y del desarrollo pre y

post-natales. Es un problema de la mayor importancia, especialmente si se tiene én cuenta que el desarrollo intrauterino depende de la barrera hematoplacentaria y que el desarrollo postnatal del cerebro —cuyas células no se renuevan, vale la pena insistir en ello— depende a su vez de las características funcionales y estructurales de la barrera hematoencefálica.

Diversos investigadores han observado la existencia de un gradiente transplacentario de los aminoácidos libres en favor del feto. Este dato sugiere que la placenta tiene la capacidad de actuar como un sistema impulsor, como una bomba de aminoácidos hacia el feto. Las alteraciones en la función de la placenta tienden a reducir el gradiente. También es posible que el feto actúe como núcleo de concentración de aminoácidos en relación a la reserva no fetal (maternal) y que el proceso del crecimiento fetal sea responsable en parte del gradiente transplacentario indicado. Esta hipótesis se fundamenta en el hecho de que las concentraciones plasmáticas de aminoácidos en la madre son menores que en mujeres adultas no gestantes. Dada la extraordinaria importancia que el gradiente transplacentario tiene en el desarrollo del feto, ya que permite al mismo una nutrición óptima en aminoácidos, es sorprendente que no se conozcan más datos sobre el gradiente normal y su significación para el feto.

El mantenimiento de este gradiente feto-materno es de especial importancia en el caso de la hiperfenilalaninemia propia del seno materno en fenilcetonúricos (4, 50).

Ya en 1927 se observó que la barrera hemato-encefálica no se hallaba totalmente desarrollada en ratón, rata, perro, conejo y gato, pero sí en la cobaya recién nacida, probablemente debido al alto desarrollo prenatal que caracteriza al cerebro de la cobaya. De acuerdo con los cambios estructurales que tienen lugar en la barrera hematoencefálica, puede concluirse que alcanza las características propias del ser adulto entre las dos y siete semanas después del nacimiento, según la especie animal que se estudie. La efusión de aminoácidos desde el cerebro en condiciones de equilibrio constituye la principal fuente de aminoácidos del líquido cefalorraquídeo. Las aminoacidopatías que cursan con hiperaminoacidemia y un transporte celular eficiente, muestran una reducción muy escasa de la relación plasma: líquido cefalorraquídeo en el pertinente aminoácido, ya que

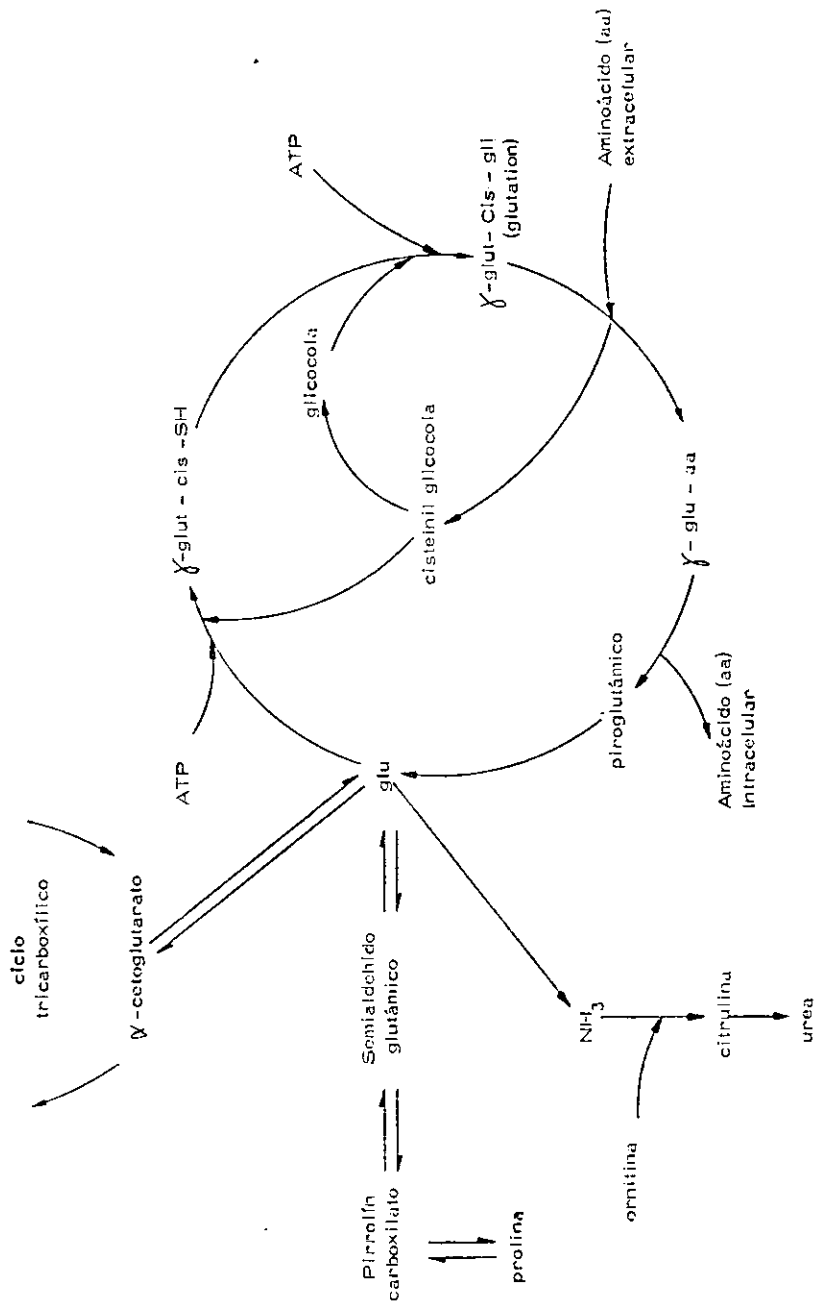

Fig. 7.—Ciclo del γ-glutamil y vías metabólicas relacionadas (62).

el soluto es retenido por el cerebro. En aquellas aminoacidopatías en las cuales la enzima mutante se halla presente en el cerebro, de tal modo que el acúmulo de sustrato sea muy superior a la concentración en el plasma, o en las cuales el transporte celular es poco eficiente, se puede esperar una disminución mucho mayor de la relación plasma: LCR. Cuando la relación es inferior a la unidad puede indicar una alteración metabólica primaria del tejido cerebral. Así, las alteraciones en el metabolismo de la urea —que existe en el cerebro— presenta unas relaciones plasma: LCR muy disminuidas, incluso inferiores a la unidad. Por otra parte, enfermedades como la fenilcetonuria, hiperprolinemia, etc., muestran pequeñas alteraciones de la relación plasma: LCR. En el caso particular de la fenilcetonuria, la relación refleja seguramente la capacidad del cerebro para el transporte de la fenilalanina. Su capacidad para oxidar este aminoácido es prácticamente nula: en consecuencia, la distribución prácticamente no se altera.

Como hemos indicado, Magdalena Ugarte y Fernando Valdivieso (57) han prestado una especial atención a los sistemas de transporte y, concretamente, al ciclo de Meister o del γ-glutamil (fig. 7), de gran importancia en la consideración general de las lesiones cerebrales irreversibles (17).

Muy recientemente, Sessa y Pérez (63) han publicado un amplio estudio sobre la γ-glutamil-transpeptidasa. En relación al ciclo de Meister, Eldjarn y col. (64) han estudiado un caso de eliminación de grandes cantidades de ácido piroglutámico por la orina. No se han observado diferencias en las reacciones de degradación del ácido piroglutámico. Los autores consideran que se trata de un defecto enzimático que conduce a una excesiva formación de ácido piroglutámico y sugieren que existe un déficit congénito en γ-glutamil lactamasa o γ-glutamil-glutamin lactamasa. En los dos pacientes estudiados, el riñón es el lugar en donde se forman las altas concentraciones de ácido piroglutámico que a continuación se eliminan.

2. *Lipidosis*

Han transcurrido más de noventa años desde que Tay describiera alteraciones en la región macular de los ojos de algunos niños, en

su trabajo titulado, «Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant». Unos años más tarde Sach comunicó que los pacientes que presentan dichas lesiones oculares estaban afectos de un grave retraso mental. Por la misma época (1882) Gaucher describió la enfermedad que lleva su nombre. Hasta 1965, gracias a la utilización de técnicas de gran sensibilidad y especificidad, por marcaje radioisotópico, no se pudo profundizar en el metabolismo de los glucocerebrósidos y poner de manifiesto las anomalías enzimáticas que concurrían en la enfermedad de Gaucher, en la leucodistrofia metacromática, enfermedad de Niemann-Pick o en la de Fabry. Hoy se conocen más de 10 esfingolipidosis en las cuales se han identificado las alteraciones enzimáticas correspondientes. Se ha puesto a punto la metodología para el diagnóstico de los homocigóticos y de los heterocigóticos y, en los casos de alto riesgo, la detección antenatal de estas enzimopatías.

En la figura 8 se resumen las alteraciones más importantes en el metabolismo de los esfingolípidos. Está tomada de la publicación de Roscoe O. Brady (65), el autor que sin duda alguna ha realizado mayor número de aportaciones para el conocimiento de la etiología, diagnóstico y tratamiento de las lipidosis (66). El profundo conocimiento de algunas etapas metabólicas, realizado en los últimos años, permite en la actualidad, de una parte, establecer aquellos pasos que presentan mayor labilidad (es decir, la incidencia de mutación genómica es mayor) y aquellos de los que no se conocen alteraciones metabólicas, bien porque sean más resistentes a la mutación o bien porque su carencia conduciría a la inviabilidad del feto. Así, por ejemplo, en el caso de las lipidosis puede establecerse la posibilidad de que exista una alteración metabólica caracterizada por el acúmulo de fucoglucolípidos y glucoproteínas (los fucoesfingolípidos son componentes normales del intestino y puede esperarse la existencia de una alteración en los sistemas de degradación de estos lípidos, que iría acompañada de alteraciones psicomotoras). Otras enfermedades potenciales en el metabolismo de los esfingolípidos serían: deficiencia de ceramidasa, la enzima que cataliza la separación del radical de ácido graso de la molécula de ceramida; deficiencia en esfingosina cinasa o en esfingosil-fosfato aldolasa, enzimas directamente implicadas en la disponibilidad del producto final del catabolismo es-

ENFERMEDAD	PRINCIPAL ESFÍNGOLIPIDO ACUMULADO	DEFECTO ENZIMATICO
Gaucher	Cer — Glc Glucocerebrosido	β-Glucosidasa
Niemann-Pick	Cer — PChol Esfingomielina	Esfingomielinas
Krabbe	Cer — Gal Galactocerebrósido	β-Galactosidasa
Leucodistrofia metacromática	Cer — Gal Sulfático	Sulfatidasa
Lipidosis por ceramida-lactósido	Cer — Glc — Gal Ceramida-lactósido	β-Galactosidasa
Fabry	Cer — Glc — Gal — NAc Gal Ceramida-trihexósido	α-Galactosidasa
Tay-Sachs	Cer — Glc — Gal — NAc Gal Ganglósido GM_2	Hexosaminasa A
Variante de Tay-Sachs	Cer — Glc — Gal — Gal — NAc Globósido y ganglósido GM_2	Hexosaminasa total
Gangliosidosis generalizada	Cer — Glc — Gal — NAc Gal — Gal Ganglósido GM_1	β-Galactosidasa

Cer = N-Acil-esfingosina (ceramida) Glc = Glucosa PChol = Fosforil-colina

Gal = Galactosa NAcNA = Acido N-acetil-neuramínico. NAcGal= N-acetil-galactosamina.

Fig. 8.—Esfingolipidosis (65).

fingolipídico. Otra enfermedad potencial se caracterizaría por deficiencia en gangliósido neuraminidasa. Sin embargo, puede establecerse con precisión que una anormalidad metabólica de esta naturaleza sería letal «in útero».

Los gangliósidos se caracterizan por un rápido metabolismo en el inicio del período neonatal reduciéndose después la velocidad considerablemente. Parece razonable asumir que los glucocerebrósidos se acumulan en las neuronas de las formas infantiles de la enfermedad de Gaucher debido a un bloqueo de la penúltima etapa del catabolismo de los gangliósidos. Si los pacientes de la enfermedad de Gaucher tienen suficiente actividad residual glucocerebrosidasa en su sistema nervioso para permitir el «turn over» normal de los gangliósidos en la infancia, los pacientes podrán sobrevivir presentando únicamente manifestaciones secundarias de la enfermedad, pero sin afectarse o afectándose muy suavemente el sistema nervioso central. Si la enfermedad progresa en los tejidos periféricos se debe a la eritrocitorrexis constante que en los mismos tiene lugar, que resulta en un alto acúmulo de glucocerebrósidos en la enfermedad de Gaucher, al no degradarse completamente los globósidos, glucolípidos mayoritarios del estroma eritrocítico (2).

Las *condrodistrofias* han sido extensamente estudiadas, muy recientemente, por Rimoin (67). También las *mucopolisacaridosis* en cultivos de fibroblastos han sido ampliamente tratadas en una reciente revisión de Neufeld (68).

3. *Dispurinias*

En sus importantes trabajos sobre el *síndrome de Lesch-Nyhan*, Seegmiller (69) ha demostrado que no se trata de una deleción genética sino de una mutación en un gen estructural. En efecto, la actividad de la enzima deficiente (la hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa) no se detecta en los eritrocitos circulantes de los pacientes pero una pequeña actividad, del 1 al 2 por 100 de la normal, ha podido ser puesta de manifiesto con toda claridad en fibroblastos cultivados. Gracias a esta actividad residual ha podido demostrarse que tienen lugar múltiples mutaciones diferentes en el mismo locus cro-

mosomático. El incremento de la síntesis de purinas que se produce en los pacientes se debe a un gran incremento de la concentración de fosforibosilpirofosfato. Los síntomas neurológicos (coreoatetosis, espasticidad, automutilación y retraso mental) se hallan en relación con la ausencia prácticamente total de la enzima en el tejido neuronal. La elevación de la actividad de una enzima distinta pero relacionada, la adenina fosforibosil transferasa, cuya presencia se detecta en los eritrocitos de los enfermos, se debe a un efecto estabilizador del sustrato ya que, como hemos indicado, el fosforibosilpirofosfato se halla muy incrementado.

Se ha confirmado que esta transmisión genética se halla ligada al cromosoma X. Los ensayos para un posible tratamiento preventivo de los síntomas neurológicos mediante la administración de adenina desde el mismo momento del nacimiento han resultado infructuosos. En algunos casos se ha realizado el diagnóstico antenatal, dentro de un programa preventivo para grupos de alto riesgo. La heterogeneidad hallada en este tipo de enfermedad es extraordinaria, lo cual parece poner de manifiesto un distinto gradiente de gravedad en la afección del genoma: Seegmiller ha identificado 28 pacientes con deficiencia incompleta en esta enzima. Ocho de ellos presentaban una alteración neurológica atenuada, mucho menos severa que el síndrome de Lesch-Nyhan, de tal modo que no se les había reconocido previamente la relación de su enfermedad con el metabolismo purínico. Debido a la alta incidencia en los mismos de litiasis renal úrica y artritis gotosa, pudieron ser examinados en centros urológicos y reumatológicos.

Es muy interesante poner de manifiesto los conocimientos que una enfermedad tan excepcional como el síndrome de Lesch-Nyhan ha permitido aportar sobre la patogenia y tratamiento racional de otras formas relacionadas mucho más frecuentes. Desde hace siglos *la gota*, enfermedad tan extendida y progresiva en el mundo civilizado, ha sido tratada empíricamente mediante un régimen apropiado, colchicina y, más recientemente, por uricosúricos. El síndrome de Lesch-Nyhan no es más que una forma particular y extrema de un conjunto de alteraciones que tienen lugar en la infancia, la adolescencia y en el adulto, caracterizadas todas ellas por un factor bioquímico común: la carencia del sistema enzimático de la hipoxantina-

guanina-fosforibosiltransferasa. Dentro del gradiente indicado, han podido ponerse de manifiesto por Delbarre y col. algunos gotosos, sin sintomatología neurosíquica específica, que presentaban una alta hiperuricemia juvenil y reacción anormal a las pirazol-pirimidinas. En estos casos —que pueden cifrarse en el 1 al 2 por 100 de los gotosos comunes— los niveles de enzima en hematíes son prácticamente nulos, hallándose en cambio muy incrementada la adenina transferasa. Como vemos, la hiperuricemia y la hiperuricosuria gotosas pueden resultar de la carencia específica, parcial o total, de una enzima implicada en la síntesis «de novo» de los uratos, si bien vale la pena insistir en la infrecuencia de tales disenzimias uricógenas. Los autores indicados han puesto de manifiesto, en una familia de gotosos aparentemente comunes, la carencia de adenina fosforibosil transferasa. En éstos, como en los casos más frecuentes, lo importante es llegar a una terapéutica que permita la inhibición de la síntesis ya que —normalmente y en la gota común— la hipoxantina y la guanina se transforman por la transferasa tan repetidamente mencionada en ácido guanídico, regulador por retroalimentación de la amidotransferasa, que interviene en las primeras etapas de la síntesis úrica, concretamente en la formación de la fosforibosilamina. En las enfermedades carenciales en la hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa, la ausencia de regulación «feed-back» provoca una aceleración del proceso biosintético, que cursa con hiperuricemia e hiperuricosuria, hiperxantinemia e hiperxantinuria, características analíticas halladas en el síndrome de Lesch-Nyhan y enfermedades relacionadas. Los hipouricemiantes modernos se basan, principalmente, en: a) derivados del ácido orótico, capaces de captar fosforibosil pirofosfato; b) inhibidores de la xantinaoxidasa (alopurinol, oxipurinol y tiopurinol), y c) inhibidores de la amidotransferasa (pirazolo-pirimidinas).

4. *Otros ejemplos*

Muchas son las enfermedades de las que ahora se conocen variantes y subgrupos: las variaciones clínicas y químicas observadas reflejan diferencias en la proteína enzimática, clave de la anormalidad metabólica. Se conocen evidentemente mejor aquellos estados pato-

lógicos que se detectan en muestras de fácil disponibilidad (tales como elementos figurados sanguineos o fibroblastos) que aquellos que se concretan a un tipo determinado de células (como la fenilalanina hidroxilasa hepática).

Lógicamente, la *patogenia congénita del eritrocito* ha sido estudiada con especial detenimiento, tanto por su importancia objetiva como por la facilidad de obtención de los glóbulos rojos para su investigación. Son numerosas las enfermedades moleculares que pueden ser detectadas examinando la carga enzimática eritrocítica, a pesar de que la deficiencia enzimática no comporte manifestaciones hematológicas clínicamente importantes. Este es el caso de la galactosemia, acatalasemia, deficiencia en colinesterasa, etc.; por otra parte, los eritrocitos son fácilmente alcanzables y modificables por tratamientos que modifican su entorno e influyen en su metabolismo, mediante una técnica tan sencilla como la administración endovenosa de diversas sustancias. Las reacciones catalizadas por NAD y NADH así como aquellas que tienen como cofactor el piridoxalfosfato pueden ser estimuladas, según ha podido apreciarse experimentalmente, mediante la administración de ácido nicotínico o de piridoxina.

En lo que se refiere *a anomalías genéticas que afectan a proteínas eritrocitarias*, las más importantes son las hemoglobinopatías, alteraciones que ya hemos tratado y a las que debemos la mayor parte de nuestros conocimientos en patología molecular. También se conocen alteraciones de algunas enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, piruvato cinasa, 2,3-difosfoglicerato mutasa, hexocinasa, fosfoglicerato cinasa, etc.

Diremos, por último, que las enzimopatías del *metabolismo de los ácidos orgánicos* han sido tratadas extensamente por Tanaka (70) y Bondy y Rosemberg han resivado las *bases moleculares de las endocrinopatías* (3).

Diagnóstico y tratamiento

Como ya hemos mencionado, existe una metodología progresivamente sensible, específica y sencilla para la detección posnatal de enzimopatías evitables si el diagnóstico es suficientemente precoz.

En 1968, en Granada, bajo los auspicios de la Dirección General de Sanidad, iniciamos la detección masiva de enzimopatías (71). Magdalena Ugarte fue —y es— la incansable y paciente organizadora de un servicio científico y analítico que ahora, con el impulso de la Seguridad Social, va a extenderse a todo el país.

El resultado de aquella madrugadora instalación analítica para la detección de enfermedades moleculares en niños recién nacidos ha sido, en mi opinión, extraordinariamente satisfactorio. Se iniciaron después investigaciones en población subnormal, en modelos experimentales de alteraciones metabólicas congénitas, en la bioquímica del cerebro con especial referencia al período perinatal... Pero no sólo se había constituido una línea de trabajo que se convirtió en prioritaria dentro del Departamento, sino que se había creado —dentro y fuera de él— una conciencia de la importancia del tema en bioquímica aplicada y fundamental, y había servido para atraer hacia la investigación bioquímica a jóvenes licenciados que hallan especialmente sugestivo dedicar su vocación científica a temas directamente relacionados con la fisiología y patología del hombre.

El *cultivo de células* se está convirtiendo progresivamente en uno de los procedimientos de elección para la detección y estudio de alteraciones congénitas. Permite el estudio «in vitro» de las anormalidades genéticas, el diagnóstico de los heterocigotos y la investigación de heterogeneidad genética. Los cultivos diploides de fibroblastos humanos obtenidos por biopsia cutánea permiten profundizar en la etiología y consecuencias de estas enfermedades. Pero es que además, el cultivo de las células amnióticas permite el diagnóstico antenatal, así como un estudio detenido de sus características, ya que pueden mantenerse incluso durante 30 resiembras sucesivas. Alrededor de 30 alteraciones se han detectado utilizando cultivos de células amnióticas. Nadler ha realizado una revisión de este tema (72).

Como sucede en el caso de otras alteraciones metabólicas, el diagnóstico en útero de la enfermedad de Pompe (glucogenosis tipo 2, autosómica recesiva, caracterizada por la acumulación de glucógeno en corazón y músculo esquelético, cerebro, hígado y riñón, debida a la deficiencia en la enzima lisosómica α-1,4-glucosidasa) debe basarse en la presencia o ausencia de dicha enzima en las células cultivadas de líquido amniótico y no en la actividad α-glucosidásica del

líquido amniótico. En términos generales, de acuerdo con Nadler, si se emplea líquido amniótico para el diagnóstico de deficiencias enzimáticas en el feto, deben observarse los siguientes criterios: 1) debe comprobarse que la enzima presente en el líquido amniótico es idéntica a la que existe en otros tejidos; 2) debe demostrarse asimismo que la enzima del líquido amniótico es de origen fetal y no materno: 3) la enzima debe hallarse siempre presente en el líquido amniótico normal y ausente únicamente cuando el feto padece la alteración molecular correspondiente; 4) deben establecerse las propiedades de la enzima (por ejemplo, estabilidad, termolabilidad, etc.).

En la mayor parte de las metabolopatías, no es posible la detección de metabolitos en el análisis directo del líquido amniótico, debido a que la circulación materna puede normalmente retirar de la circulación fetal el compuesto que se acumula en cada caso (73). Existen algunas excepciones, como la de la acidemia metilmalónica. El metilmalonil CoA, sustrato activo de la mutasa que lo transforma en succinil CoA, debe ser hidrolizado a metilmalonato antes de que pueda difundir al espacio fetal extracelular (fig. 9).

En lo que se refiere al *tratamiento de las enzimopatías*, si bien cada alteración presenta posibilidades concretas que deben ser estudiadas aisladamente, pueden establecerse unos criterios generales (74): 1) modificación de la dieta, de tal manera que la ingesta omita —en la medida oportuna— un metabolito determinado o aporte un componente carencial: 2) inhibidores de reacciones enzimáticas relacionadas, de tal manera que tiendan a anularse reacciones complementarias que pueden conducir a la producción de intermediarios poco frecuentes en el metabolismo o a incrementar su cantidad habitual: 3) favorecer el funcionamiento de actividades enzimáticas que normalmente tienen un papel secundario o bien estimular (normalmente mediante el aporte de factores coenzimáticos en cantidad masiva) la actividad o afinidad de moléculas enzimáticas que puedan catalizar la reacción en el sentido deseable, situación que se produce cuando la alteración en la estructura de la molécula enzimática no conduce a la inhabilidad total para el ejercicio de su función o cuando existe una enzima que, con eficiencia mucho menor, cataliza la misma reacción enzimática; 4) en algunos casos, administración de la enzima carencial altamente purificada a partir de tejidos o líquidos biológicos humanos. Así, por ejemplo, se ha administrado hexosaminidasa A

purificada hasta homogeneidad a partir de orina humana, administrándose por infusión en un paciente con deficiencia total en esta enzima (variante de la enfermedad de Tay-Sachs). Pero la vida media de la enzima administrada intravenosamente resultó ser extremadamente corta. Por otra parte, y como era de esperar, no atraviesa la

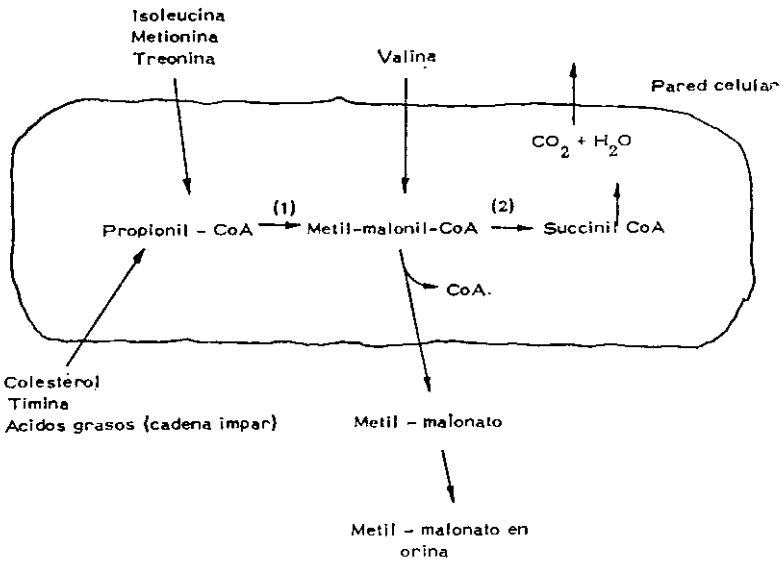

Fig. 9.—Representación esquemática de una célula fetal. Los precursores del propionil CoA y la valina pueden difundir libremente de la célula en ambas direcciones y, en consecuencia, son aportados por la madre. Contrariamente, el metilmalonil — CoA debe liberar el CoA antes de difundir al espacio extracelular, convirtiéndose en un sustrato relativamente inactivo, que es eliminado por la orina (73).

barrera hematoencefálica, por lo cual, debido a su lugar de acción, podría pensarse en su infusión directa en el cerebro o producir alguna modificación en la selectividad de transporte, alterando la barrera hematoencefálica o modificando la propia estructura proteica. Sin embargo, la prospectiva de la terapéutica basada en el reemplazamiento enzimático no es muy alentadora, excepto en algunos casos específicos en que el lugar de acción de la enzima administrada no tenga insalvables problemas de acceso; 6) evidentemente, la posibilidad de reemplazamiento del órgano del paciente en el cual existe

la enzimopatía por otro procedente de un ser normal, permitiría aliviar sustancialmente el cuadro clínico, siempre que el deterioro producido por la enfermedad no hubiera alcanzado ya niveles críticos. Este es el caso de la enfermedad de Fabry, una lipidosis, que puede ser corregida mediante transplante renal. Aparte de los problemas inmunológicos que plantea esta alternativa terapéutica, su aplicación es ciertamente restringida; 7) aporte de la actividad enzimática deficitaria mediante circulación sanguínea extracorporea, que permite la acción de las enzimas deficitarias retenidas sobre soportes sólidos; 8) aplicación de lo que se ha venido en llamar incorrectamente «ingeniería bioquímica», corrigiendo la deficiencia genética mediante el aporte de la información correspondiente por transducción con virus no patológicos que introducen en la célula el cistrón oportuno. El mensaje apropiado debe ser introducido en el genoma viral. Es muy difícil la predicción de los resultados prácticos que puedan obtenerse con este tipo de experiencias. La modificación del genotipo humano pertenece todavía al campo de la pura especulación teórica y es difícil prever que, en un futuro razonable, puedan alcanzarse resultados que permitan mejorar los tratamientos que hoy se realizan modificando el fenotipo y el entorno. El tratamiento con corticoides y con fenobarbital permite la inducción de determinadas actividades enzimáticas, proporcionando un camino de investigación interesante en el tratamiento de alteraciones de esta naturaleza. Así, por ejemplo, se ha conseguido estimular la actividad glucosa-6-fosfatasa en un paciente con glucogenosis tipo 3, mediante la administración de corticoesteroides. También el fenobarbital produjo considerable incremento en la actividad de la glucoronil transferasa en pacientes afectos de hiperbilirubinemia. No se conoce el mecanismo de esta respuesta al fenobarbital, pero la inducción enzimática constituye ciertamente un amplio camino de investigación. Junto a la inducción, la represión de la actividad genética mediante la utilización de productos terminales, puede constituir también un importante tema para el estudio de la posibilidad de tratamiento de estas alteraciones a nivel genético.

La terapéutica preventiva constituye, sin lugar a dudas, una vez más, el procedimiento de elección. La posibilidad de disponer de unos sistemas analíticos sensibles y fácilmente aplicables para la detección de homocigotos y, sobre todo, de transportadores hete-

rocigóticos, constituye la base más sólida, a través de un consejo genético de amplia aplicación, para la evitación de estas enfermedades moleculares, si bien es necesario que la sociedad sea una parte activa y no un observador pasivo en la implantación de unos sistemas de prevención que tanto contribuirían a mejorar la salud, especialmente mental, del hombre de nuestro tiempo.

No cabe duda de que el futuro del diagnóstico y del tratamiento se acercarán progresivamente a la individualización de la enfermedad o, mejor, a la personificación de la enfermedad. El conocimiento de la enfermedad, en términos genéricos, es condición necesaria, pero no suficiente: es necesario conocer también las características de la persona, siempre distinta, que padece la enfermedad. Y la primera aproximación a este conocimiento personal es la generalización de pruebas analíticas, de exámenes analíticos masivos, que permitan la adecuada aplicación de los conocimientos generales a cada caso particular.

La amniocentesis, a partir de muestras tomadas entre las semanas 12 y 16 del embarazo, está siendo progresivamente utilizada, especialmente en los grupos de alto riesgo, para la prevención de enfermedades cromosómicas. Desde luego, el costo de las enfermedades genéticas evitables no debe ser medido en términos económicos, sino en algo mucho más profundo y difícilmente evaluable como es la tragedia familiar que representan. Sin embargo, incluso estos índices más crudos e incompletos, como los económicos, pueden ser ilustrativos: en los Estados Unidos el cuidado a la población afecta de mongolismo representa 1,8 «billones» de dólares anuales, y tenemos que tener en cuenta que el mongolismo es una —la más frecuente— de las 40 alteraciones cromosómicas que pueden prevenirse en la actualidad. Desde luego, estos progresos científicos requieren cambios en actitudes morales y legales tradicionales. Se trata de una nueva modulación de los valores sociales, de tal manera que a cada nueva vida se le de todo el valor que tiene y se le preste toda la atención que hoy el desarrollo humano y la civilización pueden aportar. Cuando contemplamos multitudes desnutridas y millones de niños sin la más elemental atención médica pensamos que, realmente, es necesaria una nueva valoración de lo que, religiosamente incluso, representa la vida humana. Al hombre se le pedirá cuenta de los talentos que se le han confiado. Al contemplar la atención que se

presta a la juventud enferma y necesitada, al contemplar especialmente la desproporción que existe entre el crecimiento demográfico previsible y los medios que se están poniendo para remediar las situaciones actuales y las venideras, se obtiene una impresión realmente desconsoladora. Es urgente que los científicos conscientes de estos problemas no permanezcan por más tiempo en silencio.

Tenemos que hacer frente a las necesidades que producen sufrimiento, sean de la índole que sean. Nada habremos hecho si al progreso sanitario no corresponde un progreso social que permita la aplicación y utilización de estos conocimientos por las colectividades. La sanidad no es un problema técnico sino un problema social y la política sanitaria una de las más relevantes facetas de la política social, es decir, de la política. Recientemente, Mahler, director general de la OMS, ha dicho: «la salud es una cuestión política y la política es la salud a escala social. Tenemos que preocuparnos siempre de encontrar medios prácticos de aplicación de los conocimientos —nuevos y viejos— en favor de las grandes masas de población mundial. Este es el desafío que tenemos que aceptar». Y es obvio que no pueden esgrimirse aspectos económicos, ya que todos sabemos las grandes inversiones destinadas no a la salud, sino a la guerra.

Todo nuevo conocimiento puede ser utilizado en beneficio del hombre o puede contribuir a su degradación. Es nuestra responsabilidad procurar —sin prejuicios y con la mente clara— que se utilicen siempre correctamente. Este es el reto formidable que tenemos planteado.

Es de esperar que la ciencia, que no es más que el progresivo desvelamiento de los misterios de la creación, ayude al hombre. Al hombre, criatura de Dios. Comprendereis ahora porque, al principio, os decía que todos debemos contribuir a que el nacimiento constituya, también desde el punto de vista médico y de atención social, un acontecimiento al menos tan importante como la muerte.

BIBLIOGRAFÍA

(1) SCHAPIRA, G. y DREYFUS, J. C.: *Patologie moleculaire*. Masson et Cie, Editeurs, Paris (1975).

(2) BRADY, R. O.: *Diseases of metabolism*. P. K. Bondy, Ed., 1969; W. B. Saunders, Co. Philadelphia, USA.

(3) BONDY, C. P. K.: *Diseases of metabolism*. W. B. Saunders, Co. Philadelphia, USA (1974).

(4) ROSEMBERG, L.: *Diseases of metabolism*. P. K. Bondy, Ed. W. B. Saunders, Co. Philadelphia, USA (1974).

(5) NYHAN, W. L.: *Heritable disorders of aminoacid metabolism. Patterns of clinical expression and genetic variation*. W. L. Nyhan, Ed. John Wiley & Sons, New York (1974).

(6) SCRIVER, C. R.: «Brit. Med. Bull.», 25, 35 (1969).

(7) DREYFUS, J. C.: «Biochimie», 54, 559 (1972).

(8) HOPKINSON, D. A.: «Biochimie», 54, 575 (1972).

(9) SCHAPIRA, F., DREYFUS, J. C. y SCHAPIRA, G.: *Enzymes and isozymes*. Academic Press, Londres (1970), pág. 305.

(10) SOLS, A., REEVES, R. E. y GANCEDO, C.: *Metabolic interconversion of enzymes*. Springer-Verlag, Berlin (1974), pág. 393.

(11) CLEMENTS, G. B.: *Advances in cancer research*. G. Klein y S. Weinhouse. Ed. Academic Press, 21, 272 (1975).

(12) VOGEL, F. y RATHENBERG, R.: *Advances in human genetics*. 5, 295 (1975).

(13) EPPENBERGER, H. M.: *The control of isoenzyme patterns in development*, págs. 217-255, del libro *The biochemistry of animal development*. R. Weber. Ed. III, Academic Press (1975).

(14) MASTERS, C. J. y HOLMES, R. S.: *Haemoglobin, isoenzymes and tissue differentiation*. North Holland Pub. Co. Amsterdam (1975).

(15) ZINKHAM, W. H., SENSEE, H. y RENWICK, J. H.: «Science», 164, 571 (1969).

(16) TURNER, T. C., MAIER, V. y EPPENBERGER, H. M.: «Develop. Biol.», 37, 63 (1974).

(17) MAYOR, F.: *Regulación hormonal perinatal*. «Biología perinatal». J. Botella y A. M. Municio, pág. 276. Instituto de España, Madrid (1975).

(18) KRAMER, K. J., LAW, J. H., REIBSTEIN, D. y SANBURG, L. L.: *Control mechanisms in development*. «Adv. in Exp. Med. Biol.», 62, 123 (1975).

(19) FRITZ, P. J., WHITE, E. L., WESELL, E. S. y PRUITT, K. M.: «Nature», 230, 119 (1971).

(20) MELÉNDEZ, E. y MUNICIO, A. M.: «Int. J. Biochem», 3, 437, 482 (1972).

(21) PASTERNAK, C. A.: *Cell differentiation*. Wiley-Interscience, London (1970).

(22) WEINHOUSE, S., SHATTON, J. B., CRISS, W. E. y MORRIS, H. P.: «Biochimie», 54, 689 (1972).

(23) SOLS, A.: *Reflections on biochemistry*. Pergamon Press, Oxford (1976).

(24) KURATA, N., MATSUSHIMA, T. y SUGIMURA, T.: *Isozymes: Biochemical and Genetic Studies*. P. Clark et al. MSS Information Corporation, New York (1973).

(25) SCHAPIRA, F. y HATZFELD, A.: «Biochimie», 54, 15-6, 695 (1972).

(26) BUITRAGO, J. M. G., MELÉNDEZ, E. y MUNICIO, A. M.: *Biologia perinatal*. J. Botella y A. M. Municio, Ed., pág. 337, Instituto de España (1975).

(27) WUNTCH, T., CHEN, R. F. and VESELL, E. S.: «Science», 167, 63 (1970).

(28) MARKERT, C. L.: *Isozymes. Genetics and evolution*. Ed., Academic Press, New York (1975).

(29) NEURATH, H., WALSH, K. A. y GERTLER, A.: *Metabolic interconversion of enzymes*. Springer-Verlag, Berlin, pág. 301 (1974).

(30) LEVITZKI, A.: *Subunit enzymes. Biochemistry and functions*. K. E. Ebner, Ed. Marcel Dekker Inc. New York, pág. 1 (1975).

(31) SCANDALIOS, J. G.: *Isozymes*. C. L. Markert, Ed. Academic Press, vol. IV, pág. 1 (1975).

(32) GOODMAN, M., WILLIAM MOORE, G. y MATSUDA, G.: *Isozymes*. Cl. Markert, Ed. Academic Press, vol. IV, pág. 181 (1975).

(33) HUISMAN, T. H. D.: «Adv. Clin. Chem.», 15, 149 (1972) y *Adv. in human genetics*, 5, 165 (1975).

(34) KABAT, D. y KOLER, R. D.: *Advances in human genetics*. H. Harris y K. Hirsch Horn, Ed. Plenum Press. New York, pág. 157 (1975).

(35) DALE, G. L. y POPJÁK, G.: «The Journal of Biol. Chem.», 251/4, 1057 (1976).

(36) COTTON, R. G. H. y DANKS, D. M.: «Nature», 260, 63 (1976).

(37) TEDESCO y MALLMAN: *Diseases of metabolism*. P. K. Bondy, Ed. W. B. Saunders, Co. Philadelphia (1974).

(38) DICKENS, F., RANDLE, P. J. and WHELAN, W. J.: *Carbohydrate metabolism and its Disorders*. Ed. Academic Press. London and New York (1968).

(39) *The metabolic basis of inherited disases*. J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarben y D. S. Frederickson. Mc. Graw Hill Co. New York (1972).

(40) *Inborn errors of metabolism*. F. A. Hommes y C. J. Van Den Berg, Ed. Academic Press. London (1973).

(41) GIMÉNEZ, C.: *Enzimopatías congénitas*, en «Biologia perinatal». J. Botella y A. M. Municio. pág. 325. Instituto de España, Madrid (1975).

(42) GAULL, G. E., DALLAN, H. H., LAJTHA, A. y RASSIN, D. K.: *Biology of brain dysfunction*, vol. III. G. E. Gaull, Ed. Plenum Press, New York (1975).

(43) PICKERING, D. E. y FISHER, D. A.: «J. Chron. Dis.», 7, 242 (1968).

(44) MAYOR, F.: *Brain damage and perinatal biochemistry*, en «Reflections on Biochemistry». Pergamon Press Ltd., Oxford (1976).

(45) LUPIÁÑEZ, J. A., MACHADO, A., NÚÑEZ DE CASTRO, I. y MAYOR, F.: «Mol. Cell. Biochem», 3/2, 113 (1974).

(46) NÚÑEZ DE CASTRO, I., ARIAS-SAAVEDRA, J. M., MACHADO, A. y MAYOR, F.: «Mol. Cell. Biochem.», 3/2, 109 (1974).

(47) MACHADO, A., NÚÑEZ DE CASTRO, I. y MAYOR, F.: «Mol. Cell. Biochem.», 6/2, 93 (1975).

(48) BALAZS, R.: *The brain in unclassified mental retardation.* J. B. Cavanagh, Ed. Churchill Livingstone, Edinburgo, pág. 61 (1972).

(49) MOOG, F.: *Enzyme development in relation to function differentiation*, «The Biochemistry of Animal Development», vol. I, pág. 307, R. Weber, Academic Press (1965).

(50) VALDIVIESO, F., MATIES, M., UGARTE, M. y MAYOR, F. «Biochem. Medicine», 7/2, 340 (1973).

(51) UGARTE, M., MATIES, M., MARTÍNEZ-VALVERDE, M., VALDIVIESO, F. y MAYOR, F. «Mol. Cell. Biochem.», 3/12, 113 (1974).

(52) GIMÉNEZ, G., VALDIVIESO, F. y MAYOR, F. «Biochem. Medicine», 11/1, 81 (1974).

(53) VALDIVIESO, F., GIMÉNEZ, C. y MAYOR, F. «Biochem. Medicine», 12, 72 (1975).

(54) BENAVIDES, J., GIMÉNEZ, C., VALDIVIESO, F. and MAYOR, F.: *Effect of phenylalanine metabolites on the activities of enzymes of ketonebody utilization in brain of suckling rats.* «Biochem. J.» (En prensa.)

(55) VALDIVIESO, F., GIMÉNEZ, C. y MAYOR, F.: *Determination of phenylalanine metabolites in rat tissues by gas-liquid chromatography.* «Rev. Esp. Fisiol.» (En prensa.)

(56) VALDIVIESO, F., UGARTE, M., MATIES, M., GIMÉNEZ, C. and MAYOR, F.: *Free amino acids in the tissues of rats with experimentally induced phenylketonuria.* «Biochemical Medicine» (En prensa.)

(57) VALDIVIESO, F., UGARTE, M., ROSEMBERG, L. E. y TANAKA, K.: *Na+-coupled glycine transport in isolated brash-border membrane vesicles.* (En prensa.)

(58) CARBONELL, J., FELIU, J. E., MARCO, R. y SOLS, A. «Eur. J. Biochem.», 37, 148 (1973).

(59) SPRINKEL, T. J. y RENNERT, O. M.: «Journal of Neurochemistry», 26, 499 (1976).

(60) OLNEY, J. W.: *Heritable Disorders of Aminoacid Metabolism.* Patterns of Clinical Expression and Genetic variation, W. L. Nyhan, Ed. John Wiley and Sons, New York, pág. 501 (1974).

(61) MENKES, J. H., ALTER, M., STEIGLEDER, G. K., WEAKLEY, D. R. y SUNG, J. H. «Pediatrics», 29, 764 (1962).

(62) ELDJARN, L., JELLUM, E. and STOKKE, O.: *Heritable disorders of Aminoacid Metabolism.* W. L. Nyhan, Ed. John Wiley and Sons, New York, pág. 490 (1974).

(63) SESSA, G. y PÉREZ, M. M. «Journal of Neurochemistry», 25, 779 (1975).

(64) ELDJARN, L., JELLUM, E. y STOKKE, O.: *Heritable Disorders of Aminoacid Metabolism.* Patterns of Clinical Expression and Genetic Variation. W. L. Nyhan, Ed. John Wiley and Sons, New York, 1974, pág. 480.

(65) BRADY, R. O. «Biochemie», 54, 727 (1972).

(66) BRADY, R. O. «Trends in Biochemical Sciences», 1/3, 51 (1976).

(67) RIMOIN, D. L. «Advances in Human Genetics», Harris, H. y Hirsch Horn, K. Ed., Plenum Pres, New York, 1975, pág. 1.

(68) NEUFELD, E. F. «Cell communication», Cox, R. P., Ed. John Wiley & Sons, New York, 1974, pág. 217.

(69) SEEGMILLER, J. E. «Biochimie», 54/5-6, 703 (1972).
(70) TANAKA, K: «Biology of Brain Dysfunction», vol. III, G. E. Gaull, Plenum Press, New York, 1975, pág. 145.
(71) MATIES, M., UGARTE, M. y MAYOR, F.: *Detección y tratamiento de algunas enzimopatías.* «Biología Perinatal», J. Botella y A. M. Municio, Ed., Instituto de España, Madrid, 1975.
(72) NADLER, H. L. «Biochimie», 54, 677 (1972).
(73) MORROW, G.: *Heritable disorders of Aminoacid Metabolism.* Patterns of Clinical Expression and Genetic Variation, W. L. Nyhan, Ed. John Wiley and Sons, New York, pág. 61 (1974).
(74) ROYER, P. «Biochimie», 54/5-6, 784 (1972).

DISCURSO
DE
CONTESTACION

POR EL ACADEMICO DE NÚMERO
EXCMO. SR. PROF. DR. D. ANGEL
SANTOS RUIZ.

Excmo. Sr. Presidente.
Sres. Académicos.
Señoras, señores:

En una tarde del mes de enero de 1959, en la sesión solemne de inauguración de curso, recogió el Premio de esta Real Academia de Farmacia —que llevaba implícito el nombramiento de miembro correspondiente— un dilecto y joven discípulo mío: el Dr. D. Federico Mayor Zaragoza. Desde entonces no ha dejado de colaborar con esta ilustre Corporación, que hoy reconoce oficialmente su meritoria labor acogiéndole en su seno como Académico numerario.

Mis largos años en la docencia —privilegio de la edad— me permiten contar mis alumnos por miles. El número de discípulos es, por lógica, notablemente más restringido y uno de ellos es Federico Mayor Zaragoza. En los que conmigo trabajan prefiero, gozosamente, que me sobrepasen a que se limiten a seguirme. He procurado —y no sé si siempre lo he conseguido— no ser un maestro dominante que impone límites al pensamiento de sus seguidores. De ambicionar alguna autoridad sería la de hacer pensar, y no necesariamente, en mi dirección. Creo que es preferible una oposición viva a una aprobación muerta. Decía Nietzsche —en la humildad que supone el orgullo abatido por la verdad inaccesible— que poco agradecimiento se le puede deber a un maestro con el que no se pasa de ser discípulo. Permitidme la doble vanidad de destacar aquí, y ahora, que Federico Mayor Zaragoza ha sido mi discípulo y que me ha superado.

I

No es tarea fácil, aunque sí asequible, el encuadrar la personalidad de Federico Mayor Zaragoza en una rigurosa sistematización. Tampoco pretendo fijar en un esquema los varios aspectos de su

conducta. En general las concepciones apriorísticas que pueda esbozar de sus funciones se desbordan y, al mismo tiempo, se entrecruzan. Me enfrento, pues, con una cuestión compleja que resiste a la simplicidad de una breve exposición. Por tanto, la misión mía será, fundamentalmente, un «excursus» breve sobre la obra del recipiendario y sobre su biografía.

En Federico Mayor Zaragoza quiero resaltar que, entre lo telúrico estable y lo circunstancial mudable, ha habido siempre una meta fija en su propensión a un destino bioquímico: Becario; Ayudante y Colaborador científico del Departamento de Bioquímica del Centro Coordinado en la Facultad de Farmacia de Madrid del Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Profesor Adjunto de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid; Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada; Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid; Director del Centro de Biología Molecular; Presidente de la Sociedad Española de Bioquímica.

En términos filosóficos la parálisis del movimiento es la tristeza o anía que supone estrictamente esterilidad, pero Federico Mayor Zaragoza es hombre con sonrisa a flor de labio, reflejo de un talante risueño que supera lo puramente fisiológico. En él se cumple aquello de que «el corazón alegre hace sonreír la cara» del Libro de los Proverbios. Su contexto significa prontitud, agilidad y entusiasmo al servicio de la vida. En él la persona se cumple y se despliega, conforme a lo que como ser existente significa: es decir, con fecundidad. En efecto, la labor de Federico Mayor Zaragoza ha sido muy prolífica en todos los aspectos.

En su extensa producción científica se distinguen tres períodos: de 1956 a 1963; de 1963 a 1972 y de 1972 a 1976.

De 1956 a 1963 realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid investigaciones sobre la glutamato descarboxilasa y, como consecuencia, sobre el metabolismo del 4-aminobutirato en diversos orígenes, especialmente aquellos caracterizados por un metabolismo hipóxico cual es el caso de las plantas suculentas. Al hilo de la glutamato descarboxilasa comenzó también a trabajar sobre glutamato deshidrogenasa y, al observarse un distinto comportamiento, según la dis-

ponibilidad de oxígeno, se iniciaron una serie de trabajos sobre enzimas del ciclo tricarboxílico en condiciones de hipoxia.

De 1963 a 1972 continuó la labor investigadora, que había empezado en Madrid, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, sin perder su conexión científica con el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, la cual duró hasta 1967, en que sus absorbentes obligaciones en el nuevo centro universitario le impidieron continuarla. En 1968 puso a punto una serie de determinaciones para el diagnóstico precoz de enzimopatías que se hicieron obligatorias en la provincia granadina. Paralelamente investigó sobre la etiología de la fenilcatonuria, como ejemplo de causas promotoras en retraso mental, en modelos experimentales tales como ratas tratadas con inhibidores de la fenil-alanina-hidroxilasa. También se pusieron en marcha una serie de trabajos sobre gluconeogénesis con utilización de hígado perfundido, y continuados después en hepatocito aislado. Junto a la gluconeogénesis hepática y renal estudiaron, además, el empleo de cuerpos catónicos especialmente en cerebro.

Poco a poco, por diversas vías, se iba adquiriendo preparación y dotación experimental para confluir en un tema de gran trascendencia: la bioquímica perinatal y, concretamente, el estudio bioquímico de las causas de retraso mental. Por ello, desde 1972 hasta la fecha, la labor investigadora del Profesor Mayor Zaragoza ha seguido principalmente en este campo, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. La marcha de los trabajos experimentales sigue las líneas fundamentales relacionadas con la profundización en el conocimiento de la etiología de la fenil-cetonuria y de la histidinemia, y se dedica especial atención al conocimiento bioquímico de los fenómenos hipóxicos y del daño cerebral.

De manera paralela a la labor experimental aludida se ha investigado, asimismo, sobre otros temas de interés bioquímico, entre los que destacan los referentes a biogénesis de terpenos, bioquímica de la germinación y enzimas vegetales. El número de publicaciones especializadas en revistas científicas nacionales y extranjeras rebasa ya el centenar.

II

Caben dos acepciones metafísicas del tiempo: una es la duración de lo que cambia; otra es la medida de los cambios. En ambas hay relación de cambio a tiempo. Donde nada cambia, el tiempo no tiene ningún sentido, pero en el caso de Federico Mayor Zaragoza sí que lo tiene, ya que su vida ha supuesto un evolucionar hacia un incremento de su acervo docente, científico y humano. Y lo ha hecho con decisión, que es una fuerza innovadora; y con ocurrencia, que es la suscitación de algo nuevo. Federico Mayor Zaragoza ha trabajado en ambientes y escuelas científicas de otros países y especialmente la del Premio Nobel Profesor Krebs, en Oxford. Estos nuevos jalones en su formación integral han estimulado su capacidad creadora, con su anejo el anhelo de hacer, de transmitir y de dar. Consecuencia evidente es su personal magisterio, que ha plasmado en la dirección de una treintena de tesis doctorales y en discípulos varios que hoy son ya profesores numerarios de Universidad o investigadores distinguidos.

El énfasis ficticio suele brotar en épocas de decadencia, cuando lo artificioso supera a la sencillez, y entonces hay afectación en lo expresado, en el gesto o en el tono. Sin embargo, creo que no importa cierto énfasis, al referirme al buen quehacer científico de Federico Mayor Zaragoza, si es natural y sincero, puesto que supone una figura retórica que permite dar a entender más de lo que realmente se indica con las palabras empleadas. Por otra parte, la razón, según la expresión pascalina, sufre siempre la humillación de tener que explicarlo casi todo; pero queda el casi: ese «no se qué que queda murmurando», de San Juan de la Cruz.

A tal respecto debo señalar que el Prof. Mayor Zaragoza ha realizado diferentes versiones de temas científicos para la *Mac Graw Hill Encyclopedia*. Ha traducido el libro *Vitamin Assay* de Strehescker y Henning y ha publicado una monografía y dos libros. Sus artículos científicos son muy apreciados y su actividad como conferenciante realmente desusada; hasta este momento ha pronunciado, en España y en el extranjero, más de setenta discursos y conferencias de alto nivel. Ha organizado diversos ciclos de lecciones especiales

acerca de enzimopatías, reflexiones bioquímicas sobre la vida y enzimología. Los coloquios en que ha tomado parte alcanzan una alta cifra.

Sus artículos, revisiones y conferencias no se pueden titular de vulgarizadores, puesto que han sido un ordenar conocimientos sintéticos, traducidos a formas claras y vivas, que no traicionan la dificultad de los problemas. Han sido, por el contrario, una actividad superior, en la búsqueda del saber por el hombre.

Ha asistido y ha sido ponente en ocasiones en múltiples certámenes científicos nacionales e internacionales. Prácticamente ha participado, desde 1958, con más de setenta comunicaciones en todos los Congresos Internacionales de la *International Union of Biochemistry* (IUB), *Federation European of Biochemical Societies* (FEBS) y *Journèes Biochimiques Latines* (J. B. L.). Ha sido miembro del Comité Nacional de la Unión Internacional de Bioquímica y es *Senior Member* del *Trinity College* de Oxford.

No solamente ha tomado parte en reuniones científicas sino que también ha sido organizador de las mismas. Entre ellas destacan: Congreso de la SEB en Granada, en 1967; Simposio Internacional sobre *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action of Protein Synthesis and Membrane* en Granada, en 1970; *Conference on Prospects for Hereditary Metabolic Diseases Control*, en Granada en 1973, y el *International Symposium* en homenaje al Prof. Ochoa en Barcelona y Madrid en el último mes de septiembre. Excusado es decir que sus intercambios científicos con muy distintos países, son tan estrechos como fructíferos. En calidad de Principal Investigador ha disfrutado de *Grants* del *Agricultural Research Service* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

III

Pedir, y aun implorar, es humano, pero ser agradecido lo es más todavía. Como ha señalado Bollnow, no hay otra cualidad que manifieste mejor la salud interior, espiritual y moral. Mientras que la fidelidad se define frecuentemente por múltiples obligaciones contraídas, la gratitud es una actitud de fondo, y tan delicada que se desvanece

al menor descuido. La gratitud es confianza en el presente y esperanza en el futuro. Ser agradecido es propio de los mejores y esta actitud ha sido siempre hacia mí una inolvidable constante de Federico Mayor Zaragoza, que me complazco en señalar. De los años en que hemos laborado juntos ha quedado entre ambos una inmarcesible amistad, llena de generosidad, especialmente por su parte.

El conocimiento del carácter significa, en gran parte, el de las promesas que en un determinado ser se encierran, y de ahí que no pueda ser completo. Mounier ha expresado bien que el carácter es un acto, no un dato. Así como la teología se coloca ante El, la caracteriología lo hace ante el hombre. En el caso de Federico Mayor Zaragoza sus condiciones humanas de simpatía y su aspecto inteligente son reflejo de la verdad de su personalidad. En este caso se cumple el viejo refrán: «la cara es el espejo del alma». Es evidente su capacidad para las relaciones públicas, y no puede extrañar su pertenencia a numerosas sociedades científicas nacionales y extranjeras tales como: Real Sociedad Española de Física y Química; Sociedad Española de Ciencias Biológicas; Sociedad Española de Bioquímica; *European Molecular Biology Organization*; *Biochemical Society*; *Societé de Chimie Biologique*; *American Chemical Society*; *American Association for the Advancement of Science*, etcétera. Es Miembro Honorario de la Sociedad de Bioquímica de Concepción (Chile); Académico correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia del Brasil, etc. Sus capacidades amplias han sido reconocidas a través de variadas distinciones, y entre ellas: Colegiado de Honor del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Granada; Miembro de Honor de la Asociación de Antiguos Alumnos de la Facultad de Farmacia de Granada; Emblema de Oro y Colegiado de Honor de los Colegios Mayores de San Bartolomé y Santiago, Jesús María y de Loyola de Granada; Colegiado de Honor del Colegio de Farmacéuticos de Las Palmas; Colegiado de Honor del Consejo General de Colegios Médicos; Miembro de Honor de la Asociación de la Prensa de Granada; Clavel de Oro de la ciudad de Motril; Olivo de Oro de la ciudad de Jaén; Medalla de Honor de la Fundación Rodríguez Acosta, etc. Está en posesión de valiosas condecoraciones, tales como la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio y la Gran Cruz de la Orden Civil de Sanidad.

De su excelente gestión al frente del Rectorado de la Universidad de Granada quedan como elocuentes testigos la Medalla de Oro de dicho centro universitario y el muy honroso nombramiento de Rector Honorario.

IV

Las disgresiones orales o escritas van desde las obras más humildes a las más excelsas. La diferencia radica en que la banalidad de las primeras ofrece escaso interés, mientras que la maestría de las segundas supone tanto que a los exégetas todo les parece poco para apurar su análisis. El tema planteado por el Prof. Mayor Zaragoza en su discurso de ingreso, que acabamos de escuchar, ofrece la segunda perspectiva, pero el lugar y el tiempo condicionan el comentario.

El recipendiario ha expresado el concepto de Patología Molecular y ha hecho hincapié en las bases moleculares de todo proceso patológico, de tal modo que si el equilibrio se restablece, constituye una situación transitoria; en caso contrario, sobreviene la muerte.

Dentro del amplio campo que abarca la patología molecular, ha centrado el tema en las alteraciones genéticas, que condicionan no sólo la existencia de enzimas inhábiles para el ejercicio de su función, sino también alteraciones en el mecanismo, extraordinariamente complejo, de la diferenciación. Desconexión de un sistema que produce una isoenzima menos regulada, por ejemplo, y conexión de otro en una fase más avanzada del desarrollo, con un sistema de regulación más elaborado.

En lo que al polimorfismo genético se refiere, ha tratado con detenimiento las características isoenzimáticas y los mecanismos de su regulación, y es porque estima —y yo con él— que el capítulo de las isoenzimas es en la actualidad, y seguramente más en el futuro, el más destacado de la regulación metabólica y de la bioquímica del desarrollo y diferenciación.

Era importante al respecto hacer referencias a las analogías existentes entre las isoenzimas fetales y las de los tejidos tumorales, planteándose el problema de la desdiferenciación en el caso de los

tumorales y de la indiferenciación en el caso de las embrionarias y fetales. También convenía destacar que, al nacer, las isoenzimas son las menos regulables, mientras que en el adolescente y en el adulto las entonces existentes lo son ya totalmente. Ello es coherente con las necesidades energéticas del momento de adquirir autonomía vital, así como con el equilibrio que caracteriza ya la bioquímica del ser adulto.

No podía faltar tampoco en su discurso una breve referencia a las distintas proteinopatías, indicando la misión fundamental de las hemoglobinopatías en el estudio molecular de estas anormalidades. Las talasemias las ha contemplado con algún detalle, ya que constituyen un ejemplo magnífico de mantenimiento, es decir, de no desconexión, de una lectura genética fetal. Ha comentado acto seguido algunos datos muy recientes sobre algunas enzimopatías; si bien en general ha realizado somera alusión, porque así era aconsejable, a las grandes revisiones efectuadas sobre los diversos capítulos de prótidos, glúcidos y lípidos.

Su excelente disertación se ha cerrado con indicación de las posibilidades de determinación, prevención y tratamiento de algunas enzimopatías, en las que se pone de relieve la ingente labor realizada en el Departamento de Bioquímica, dirigido por el Profesor Mayor Zaragoza, en conexión tanto con el diagnóstico precoz de algunas de estas enfermedades como con los estudios de investigación realizados con fenilcetonuria inducida en animales de experimentación, que han llevado a establecer algunas contribuciones de gran interés. Yo señalaría, como ejemplo, la demostración de que los derivados de la fenilalanina inhiben la utilización de cuerpos cetónicos, absolutamente imprescindibles en el período de la mielinización cerebral que tiene lugar en el hombre y en otros seres vivos después del nacimiento.

De la importancia de la investigación perinatal, tan ligada a la labor experimental del Profesor Mayor Zaragoza y su escuela, puede dar idea el que en el año de 1975, como ha señalado K. W. Cross, se ha editado un tercer número del *British Medical Bulletin* consagrado a la investigación sobre el feto y el recién nacido. No hay duda que estas publicaciones representan una importante contribución para la ciencia, puesto que se recogen resultados de la investigación perinatal, con sus muchas aplicaciones en el cuidado del nuevo ser.

Las interesantes observaciones de G. C. Liggins, relativas a la misión del feto en el comienzo de los dolores de parto, repercutirán, probablemente, en la práctica obstétrica humana antes de que se publique un cuarto número sobre fisiología fetal y neonatal de la citada revista inglesa.

Los ensayos perinatales suponen un respiro, un alivio, que no debe borrar de nuestra mente otras actividades e impedirnos la preocupación para reflexionar sobre aspectos nada positivos. Frente a los desvelos por traer al mundo seres lo más perfectos posibles está la tendencia a eliminarlos. En consecuencia, hay que matizar severamente las manipulaciones que llevan a la supresión de nuevos seres humanos.

Un análisis adecuado obliga a un determinado léxico, puesto que la corriente moderna ha hecho cambiar rumbos y valorar, en consecuencia, en grado sumo la semántica. Por aludir a definiciones que puedan considerarse más objetivas, señalamos con Noel Baine que en el *Oxford English Dictionary* la «ética» es definida como parte del estudio que se ocupa de los principios del deber humano. El deber es la acción adecuada en relación a la obligación moral o legal. Ambas obligaciones están separadas y hay dos tipos de deber: moral y legal. La moral es un adjetivo relativo a la distinción entre bueno y malo, en conexión con las acciones de personas responsables. El deber legal está generalmente bien definido en estatutos o precedentes, pero el deber moral debe tener prioridad. De esta forma surgen tres situaciones, en las dos últimas de las cuales pueden aparecer problemas éticos: primero, los deberes moral y legal están de acuerdo; segundo, ambos deberes están en conflicto; tercero, los deberes morales no están todavía protegidos por el código legal.

El buen sentido de la tradición jurídica española añade múltiples y valiosos argumentos del derecho civil a las consideraciones de médicos, moralistas y sociólogos desde sus ángulos respectivos. El derecho español ha encontrado, desde siempre, que el atentado a la vida de un no nacido viola muchas veces no sólo los derechos de aquél, sino los de otros individuos e instituciones que merecen y exigen la protección de la ley y la tutela del Estado. Hablar sólo de la madre e incluso del niño es mutilar la realidad complejísima y

auténticamente social de la propagación de la vida, vista desde la institución familiar entera.

La insignificancia del ser humano que empieza a vivir asombra el entendimiento. Basta recordar que si juntásemos las macromoléculas codificadas que van a especificar las cualidades de cada uno de los miles de millones de individuos que nos reemplazarán sobre la faz de la Tierra, esta cantidad de material cabría en la mitad de un dedal. La nueva vida es ya «vida humana» desde el punto de la fecundación efectiva. Para el Profesor Lejeune el hombre existe desde la unión del espermatozoide con el óvulo. La célula resultante posee una individualidad genética, nueva e irrepetible. A partir de ella el embrión sigue un proceso individual determinado, según un plan señalado por el ácido desoxirribonucleico. Desde los primeros días un ser es capaz de regir su destino y estimular, por medio de un mensaje químico, el funcionamiento del cuerpo amarillo del ovario y suspender el ciclo mensual de la madre obligándola a protegerle. El hombre con su cuerpo, sus órganos, su sistema nervioso y su espíritu está presente, en potencia y forma, desde el instante mismo de la fecundación.

El hecho de que el ser humano esté contenido en potencia, en algo tan mínimo, nos hace intuir cómo la vida nos es dada: somos solamente depositarios de un mensaje que nos excede, y, sin embargo, nos construye. Cuando algunos pretenden que el sueño del embrión no es el de una persona, olvidan, como ha señalado el aludido investigador, el ejemplo maravilloso de los mamíferos más simples, los marsupiales, que al abortar espontáneamente se ocupan de proteger ejemplarmente durante largos meses a sus crías en una bolsa ventral; reconocen entrañablemente a uno de los suyos en algo tan minúsculo como una cáscara de nuez.

La gradual admisión del aborto en la legislación de más y más naciones no es argumento de su licitud moral, sino, en todo caso, prueba de la decadencia de una civilización. El aborto como defensa de la madre forzada, en el caso de una violación, añade un trauma físico al psicológico. La defensa no está en la muerte adicional, y a sangre fría, de un inocente, sino en la protección afectiva y efectiva de la madre. Las taras genéticas no constituyen tampoco una justificación del aborto, el cual no termina con las taras, sino con el

tarado; el mismo argumento sería válido para suprimir por indicación médica y orden legal a millones de ciudadanos adultos. La continuación lógica de la campaña por el aborto es la eutanasia.

El Profesor Paul Marx, de Collegeville (Minnesota), ha hecho un completo examen de las tácticas empleadas por el movimiento internacional en favor del aborto, que constituyen una máquina impulsada por los poderosos y omnipotentes medios de comunicación de masas. Al servicio de tal propósito se ponen las cuatro emes: *money*, *media*, *manpower* y *manipulation*, es decir, dinero, medios de comunicación de masas, potencial humano y tácticas para manejo de la opinión.

Resulta paradójico que muchos Estados de derecho legislen para defender la vida animal no racional, lo cual es legítimo y elogiable, y, sin embargo, colaboren oficialmente con organizaciones mundiales —así como entidades financieras poderosas— que recomiendan y ayudan a la eliminación masiva de individuos en desarrollo, con vida propia. Estremece pensar que no se consienta nacer a seres indefensos y se legalice que las madres interrumpan su embarazo. La desacralización, la corrupción de costumbres, con sus secuelas de erotismo, violencia y hedonismo ya tópicos, colaboran en muertes cuya causalidad es discriminatoria, y están preconizadas en nombre del materialismo, de una «supercivilización», que prefigura un ulterior caos apocalíptico, salvo la Providencia. Como ha indicado Orlandis, el divorcio, la legalización de la contracepción, el aborto y la eutanasia, pueden reservar al individuo un porvenir tiránico. Por supuesto, en lamentable contraste con las enfáticas declaraciones de los Derechos del Hombre, y las endechas que, monótonamente, se entonan a la dignidad de la persona humana.

Creo que ha llegado la hora de reflexionar en voz alta, y lo hago ahora en este ámbito académico, para proclamar la belleza de una aparente intransigencia cuando se opone, justamente, a la fealdad de un turbio egoísmo. Como cristianos, como científicos, como ciudadanos miembros de una sociedad civilizada, los que así pensamos tenemos el deber de hacernos oír frente a hipocresías individuales y colectivas y, en general, el celo bastardo por un supuesto bien de los demás.

Como ya he tenido ocasión de escribir en otra ocasión, los escri-

tores siembran letras; los oradores palabras; los teólogos doctrina, los padres siembran vida. Al fin y al cabo los embriones humanos son —nada más y nada menos— los futuros hijos, es decir la bendición del matrimonio, el fin de esa búsqueda de unidad que es la esencia misma del amor.

V

Es evidente que el «ser» y el «ser de una forma concreta» no pueden del todo separarse; no se da una «existencia» sin una «esencia». Frente al recipendiario tenemos ante los ojos ambas cosas y no se puede prescindir de su destino a cumplirse en sí mismo. Con una mirada anticipada podemos ver ese «proyecto» y en una primera ojeada salta a la vista la manera de ser, es decir, sus cualidades, que hemos citado, y que son tantas y buenas. Pero como esto no basta, hay que llevar el proyecto a realidad e internarse en lo posible hasta el centro de la personalidad, que se halla tras las cualidades externas y las sustenta. Una faceta importante del «ser» de Federico Mayor Zaragoza es la referente a su incursión, obligada por las circunstancias, en el campo de la administración pública. Además de haber sido Procurador en Cortes ha desempeñado el importante cargo de Subsecretario del Ministerio de Educación y Ciencia.

Es curioso observar la doble significación de la palabra servir: unas veces significa tener habilidad para realizar algo; otras estar a disposición de alguien. En la psicología del *homo politicus* opera la dialéctica que Hegel establecía como reguladora de toda relación interurbana, la del amo-esclavo, que, con otras palabras, es la de poder y servicio. Apenas habrá un solo discurso de cualquier jefe o dirigente en el que deje de presentarse como servidor de aquellos que están bajo su mando.

Casi siempre, sin embargo, el acto de servir encuentra una gran resistencia en el orgullo, como si lleváramos en el fondo del alma un centelleo del demoníaco *non serviam*. Es más atractivo enfocarlo como puesto de mando y, en el sistema de Adler, la «voluntad de poderío» constituye el eje central de la dinámica de la personalidad humana. No obstante, quisiéramos ver siempre a los gobernantes como

hombres llenos de espíritu de servicio y sólo anhelando el poder para servir mejor. Este ha sido el caso de Federico Mayor Zaragoza, que en sus cargos ha sabido resolver la paradoja servicio-poder. Ha mandado bien para servir eficazmente. Su paradigma supone no haberse recluido en la torre de los diletantes egoístas; un impulso constitucional le ha llevado a hacerse útil a los demás.

Recientemente su nombramiento de Presidente de la Comisión de Estudio de un Régimen Administrativo Especial para Cataluña, al dar pábulo a las varias inquietudes regionales, estoy convencido que contribuirá a restablecer la visión fundamental del *homo politicus* como *homo moralis*, preocupado por los problemas de fondo de la convivencia, y eliminar así la imagen del *homo pugnas* de lucha por el poder.

Federico Mayor Zaragoza ha realizado y realiza todo esto con sencillez. Los espíritus selectos no esgrimen palabras altisonantes, ni acciones superlativas y están, a pesar de ello, lejos de lo mediocre. Cuando no existe nostalgia de mejora, cuando se encuentra la expresión en la banalización y el compadrazgo, entonces es cuando se está inmerso en la mediocridad. Es indudable buen motivo de enhorabuena la subida de peldaños en bien de la comunidad, pero en el caso de nuestro nuevo Académico, será más grande la felicitación cuando le toque el arduo trance de descenderlos: lo hará con la seguridad y la firmeza del que sólo pretendió cumplir un cometido en favor de los demás.

Como vemos, circunstancias diversas han llevado a Federico Mayor Zaragoza a un protagonismo, un erostratismo en pie de guerra con el hacha desenterrada desde el alba hasta el crepúsculo. Pero es que con arreglo a premisas unamunianas, puede haber fuerte individualidad sin personalidad adecuada, fuerte personalidad con endeble individualidad y también, como en este caso, fuerte individualidad con fuerte personalidad. Su andadura yo diría que ha correspondido a las estrofas manriqueñas:

«más cumple tener buen tino
para andar esta jornada
sin errar».

Pareceré a algunos insistente en citas poéticas —y es cierto—, pero he querido hacerlo así porque en Federico Mayor Zaragoza —como en determinados frutos— debajo de la corteza de un noble pragmatismo regional, posee una pulpa jugosa transida de idealismo, que ha aflorado, en ocasiones, en rimas valiosas. Por todo lo anterior, y conocedor de sus deseos de colaboración, al recibirle hoy con júbilo, en nombre de esta antigua y prestigiosa Corporación, lo hago finalmente con la clásica serranilla del Marqués de Santillana:

«bien vengades;
que ya bien entiendo lo que demandades».

He dicho.