

CUATRO CIENTÍFICOS PRESENTARON SUS INVESTIGACIONES SOBRE «MEDICINA MOLECULAR»

■ Ciclo de conferencias de Perutz,
Viñuela, De Duve y Weatherall

Los Premios Nobel Max Ferdinand Perutz y Christian De Duve, de Química 1962 y de Medicina 1974, respectivamente, y los doctores Eladio Viñuela, del Centro de Biología Molecular, del C.S.I.C., y D. J. Weatherall, del John Radcliffe Hospital de la Universidad de Oxford, intervinieron en un ciclo sobre «Medicina Molecular», que organizó la Fundación Juan March en su sede del 5 al 26 de mayo pasado. Participó también en esta serie de conferencias científicas el Premio Nobel de Medicina 1984 César Milstein, quien presentó al doctor Weatherall. Los demás ponentes fueron presentados por José A. López de Castro, Antonio García-Bellido y Manuel Serrano Ríos.

Este ciclo continuaba la serie organizada en años anteriores por la Fundación dentro de la atención especial que viene dedicando al área científica, a través de ciclos de conferencias y del Plan de Ayudas y Becas de Biología Molecular y sus Aplicaciones.

Los ponentes

Max Ferdinand Perutz nació en Viena (Austria) en 1914. Se doctoró en la Universidad de Cambridge en 1940. De 1962 a 1979 fue Presidente del Medical Research Council, en cuyo Laboratorio de Biología Molecular sigue investigando desde entonces. En 1962 obtuvo el Premio Nobel de Química por sus estudios sobre la estructura tridimensional de la hemoglobina.

Eladio Viñuela es Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en el Centro de Biología Molecular, de Madrid. Ha sido director del

Departamento de Virología y Genética Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, catedrático «ad honorem» de Virología en esta Universidad, director del Instituto de Virología y Genética Molecular del CSIC y director del Centro de Biología Molecular.

Christian De Duve nació en 1917 en Thames-Ditton (Inglaterra) y está nacionalizado belga. Desde 1962 alterna su trabajo investigador entre el Instituto Internacional de Patología Celular y Molecular de Bruselas, del que es Presidente-Director, y la cátedra Andrew

A. Mellon de la Universidad Rockefeller de Nueva York. En 1974 obtuvo el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por sus contribuciones en el campo de la Biología Celular.

David John Weatherall es actualmente profesor en el Departamento de Medicina Clínica de Nuffield, de la Universidad de Oxford (Inglaterra); director honorario de la Unidad de Hematología Molecular del Medical Research Council, de esa Universidad; y Presidente de la Comisión de Hematología del Royal College of Physicians, desde 1982.

Max F. Perutz

«CRISTALOGRAFIA DE RAYOS
X Y DISEÑO DE DROGAS»



La hemoglobina es una molécula formada por cuatro cadenas polipeptídicas: 2 subunidades llamadas alfa y dos beta. Cada una de las cadenas posee un grupo hemo, formado por una protoporfirina y un átomo de hierro. El grupo hemo es el responsable de que esta proteína sea capaz de unirse al oxígeno. Los estudios cristalográficos por rayos X demuestran que la estructura tridimensional de la hemoglobina cambia marcadamente con la oxigenación. Además, la hemoglobina es una estructura móvil capaz de cambiar de forma según esté o no unida al oxígeno.

La anemia falciforme es una enfermedad genética frecuente en algunas zonas de África Central. Los pacientes que la sufren presentan eritrocitos de forma alargada (de ahí el nombre). Este tipo de disfunción se debe a la alteración del gen que codifica para una de las subunidades de la molécula de hemoglobina. Sólo los homocigotos recesivos muestran síntomas; los heterocigotos no sólo no padecen la enfermedad, sino que son más resistentes a la malaria que los genotipos normales. Esto ha ocasionado una presión selectiva a favor de los heterocigotos que ha mantenido en la población el gen de la anemia falciforme. Hoy sabemos que la diferencia entre la hemoglobina normal y la defectuosa se debe a la sustitución de una molécula de glutámico por una valina en una de las cadenas polipeptídicas. La hemoglobina

defectuosa presenta diferente carga que la normal y, por ello, es capaz de agregarse en largas fibras.

Hemos abordado el problema de buscar fármacos capaces de combatir esta enfermedad. Se han buscado sustancias orgánicas que fueran capaces de desagregar las fibras de hemoglobina defectuosa de enfermos de anemia falciforme. Un sencillo ensayo para medir esta propiedad consiste en añadir a una solución de hemoglobina defectuosa la sustancia orgánica que se va a ensayar. La mezcla se somete a centrifugación; el contenido de hemoglobina en el sobrenadante constituye un índice de las propiedades desagregantes de la sustancia en cuestión.

Un criterio adicional, a la hora de elegir fármacos contra la anemia falciforme, ha sido buscar sustancias que se utilicen actualmente en farmacología para corregir otro tipo de disfunción; esto ahorra una gran cantidad de trabajo a la hora de estudiar los efectos secundarios y garantiza una muy baja toxicidad del fármaco. De esta forma se han encontrado una serie de sustancias tales como el ácido etacrínico, el bezafibrato, el succinil-L-Trp-L-Trp y otros, cuyas propiedades desagregantes de la hemoglobina defectuosa los hacen muy prometedores.

En una segunda etapa del trabajo, se ha empleado la técnica de difracción de rayos X.

Esta técnica ya permitió desentrañar la estructura tridimensional de la molécula de hemoglobina. En este caso se ha empleado para estudiar los complejos que forma la hemoglobina con los distintos fármacos, permitiéndonos dilucidar el tipo de interacciones que se producen entre ambas moléculas. Ha sido necesario desarrollar programas de ordenador que faciliten la interpretación de los datos de difracción de rayos X con objeto de construir modelos espaciales. De esta forma se han estudiado detalladamente qué tipos de enlaces se forman entre la molécula de hemoglobina y el fármaco. Se trata de enlaces no covalentes, de carácter débil: fuerzas de Van der Waals y, especialmente, puentes de hidrógeno. Sin embargo, aún no conocemos cuál es el mecanismo de acción de estos fármacos, en otras palabras, cómo consigue el fármaco desagregar las fibras de hemoglobina defectuosa. El principal problema en la

aplicación de esos nuevos medicamentos radica en el hecho de que la hemoglobina sea una proteína muy abundante (constituye, aproximadamente, el 40 por 100 de la proteína total de la sangre); por lo tanto, cualquier fármaco que utilicemos tendrá que aplicarse necesariamente en altas concentraciones para que pueda interactuar con todas las moléculas de hemoglobina. En la mayoría de los fármacos estas altas concentraciones —necesarias para su acción— producen efectos tóxicos inaceptables para el organismo.

Hay que destacar que el uso de la técnica de difracción de rayos X para el estudio de la interacción entre el fármaco y la molécula sobre la que éste actúa abre un abanico de nuevas posibilidades. En un futuro próximo puede pensarse en que se llegue a diseñar racionalmente fármacos que realicen acciones específicas sobre sus moléculas blanco, combatiendo así la enfermedad.

López de Castro

«CONOCIMIENTO DE LA HEMOGLOBINA»

El nombre de Max Perutz está íntimamente ligado al conocimiento de la estructura y mecanismo de acción de la hemoglobina, la proteína mayoritaria de los eritrocitos, encargada de la captación y transporte de oxígeno. El Premio Nobel de Química 1962 lo recibió por sus estudios sobre la estructura tridimensional de la hemoglobina. Sus investigaciones, de enorme trascendencia, abrían el camino al análisis de la estructura de las proteínas a nivel atómico, y demostraban que la hasta entonces inasequible complejidad estructural de



las proteínas globulares podía ser abordada en el laboratorio por técnicas de difracción de rayos X. En los 24 años transcurridos desde el galardón, las aportaciones de Perutz al conocimiento detallado de la estructura de las hemoglobinas y de los mecanismos que regulan su afinidad por el oxígeno han sido incesantes y fundamentales. Gracias a esta labor la hemoglobina es hoy el modelo de referencia para interpretar un proceso denominado alosterismo.

Eladio Viñuela

«EL VIRUS DE LA PESTE
PORCINA AFRICANA»



La peste porcina africana es una enfermedad infecciosa del cerdo doméstico provocada por un virus. Las primeras noticias que se tienen de esta enfermedad datan de 1910, en Kenia, cuando se pusieron en contacto cerdos domésticos, llevados por colonos ingleses, con cerdos silvestres africanos, los cuales son portadores del virus aunque no muestran síntomas. En 1957 la enfermedad llegó a Portugal y a partir de entonces se ha extendido por Europa y América. En España, la mayor incidencia se produce en Extremadura, Galicia y Cataluña.

El agente causal de esta enfermedad es un virus muy específico en cuanto a la elección del huésped: sólo ataca al cerdo doméstico y a algunas otras especies de la familia *Suidae*, así como a una familia de garrapatas que actúan como vectores de la enfermedad. El virus también muestra especificidad en la célula blanco: ataca a monocitos periféricos. Un problema fundamental estriba en que el suero de los animales infectados no contiene anticuerpos neutralizantes. Esto hace suponer que existe un mecanismo de escape al sistema inmunológico. El trabajo en mi laboratorio se ha centrado precisamente en averiguar cuál es este mecanismo de escape. Sólo un conocimiento más profundo de la biología de este virus permitirá la obtención de una vacuna eficaz.

Estructuralmente, el virus de la peste porcina africana es de

gran complejidad. Consta de un nucleoide, partícula de material genético que en este caso es ADN; el nucleoide está rodeado de una bicapa lipídica, rodeada a su vez de una cápsida de proteína. Finalmente, el conjunto está rodeado de una segunda bicapa lipídica que procede del huésped.

Se ha hecho especial hincapié en el estudio de las proteínas de superficie, ya que estas proteínas son antígenos críticos potenciales. Mediante microscopía electrónica, unida al uso de anticuerpos monoclonales contra las proteínas del virus, se ha conseguido determinar la posición de estas proteínas de superficie. Otra técnica empleada consiste en tratar —de forma controlada— las partículas virales con detergentes no iónicos y estudiar las proteínas que se liberan; obviamente, serán las proteínas más externas de la superficie del virus las que se verán liberadas primero. El material genético de este virus es francamente largo: 170 kilopares de bases. Los extremos están cerrados covalentemente, existiendo dos tipos posibles de horquilla. Cerca de los extremos existen repeticiones de secuencia en tándem.

La entrada del virus en la célula huésped tiene lugar por endocitosis mediada por un receptor de la propia célula blanco. El proceso comienza por invaginaciones en la zona de contacto entre el virus y la

membrana de la célula. Posteriormente se forman vesículas que transportan al virus al interior. Aproximadamente, a los 90 minutos, aparecen partículas virales en el citoplasma.

Se ha estudiado la variabilidad del virus mediante mapeo con enzimas de restricción del ADN de una colección de 25 aislados diferentes. Así se ha visto que existe una región central constante, una región variable en uno de los extremos y una región hipervariable en el otro extremo. Mediante secuenciación del ácido nucleico de la región hipervariable se detectó la existencia de dos familias multigénicas: 110 D y 110 I.

Entre los mecanismos de evasión del virus de la peste porcina africana del sistema inmunológico del animal infectado, que pueden explicar la ausencia de anticuerpos neutralizantes, se encuentran los siguientes: a) *Supresión inmunológica*, en la que un antígeno viral irrelevante suprime la inducción de anticuerpos neutralizantes. Si esto es así, podría obtenerse una

respuesta inmunológica efectiva usando antígenos virales aislados, que potencialmente podrían ser antígenos críticos. b) *Anticuerpos bloqueantes*, que inhiben la interacción del anticuerpo neutralizante con el determinante antigénico crítico. Si esta hipótesis es correcta, debe poder obtenerse un anticuerpo monoclonal neutralizante, que permitiría identificar la proteína portadora del determinante antigénico crítico. c) *Variabilidad genética y antigénica*, cuando el gen para el antígeno crítico experimenta una alta frecuencia de mutación, o cuando existen múltiples copias para dicho gen (el caso de Tripanosomas, Neisseria gonorrhoeae y otros parásitos). En este tipo de escape, el sistema inmunológico va siempre un paso atrás con respecto a la aparición de los nuevos variantes. Hasta ahora, la única solución al problema es la identificación de una región constante en el antígeno crítico y el uso como inmunógenos de péptidos contenidos en la región constante del antígeno variable.

Antonio García-Bellido

«TODO UN RETO CIENTIFICO»

Desde hace varios años el doctor Viñuela trabaja sobre el virus de la peste porcina africana, enfermedad infecciosa que afecta a la población porcina española. El objetivo de su estudio es conocer la biología del virus y preparar una estrategia para erradicarlo. El aislamiento de los componentes de la partícula viral lo lleva a cabo el grupo que dirige Eladio Viñuela mediante métodos basados en nuevas técnicas de ingeniería genética, que per-



miten el aislamiento y caracterización de genes del virus y su subsecuente inserción en bacterias.

Del tratamiento con estos anticuerpos cabe esperar la neutralización del virus en el cerdo.

Una compleja y moderna tecnología, útil para los laboratorios españoles, y todo un reto científico, como es el entender interacciones parásito-huésped en términos moleculares, hay debajo de este esquema operativo.

Christian De Duve

«LISOSOMAS Y
MEDICINA»



Los lisosomas son orgánulos citoplasmáticos, rodeados de membrana, presentes en todas las células eucarióticas. Morfológicamente son muy variados; hasta el punto de que este polimorfismo constituye un carácter de identificación del propio orgánulo. Los lisosomas son centros de digestión, verdaderos estómagos intracelulares. En su interior contienen enzimas hidrolíticas capaces de romper los enlaces de proteínas, ácidos nucleicos, etc. Estos enzimas tienen su óptimo de funcionamiento a pH ácido.

Se conocen como *lisosomas primarios* a aquellos que, por estar recién formados, no han intervenido aún en procesos de digestión y, por tanto, sólo contienen enzimas en su interior. En contraposición, los *lisosomas secundarios*, que sí han intervenido en procesos de digestión y contienen tanto enzimas como productos de desecho, son los más heterogéneos morfológicamente.

En el modo de acción de los lisosomas distinguimos dos tipos de procesos: la *heterofagia*, que consiste en la digestión de material externo a la célula, el cual ha entrado en ella por un mecanismo conocido como endocitosis; y la *autofagia* o digestión del propio material celular. Aunque la función fisiológica más generalizada de la heterofagia es la nutrición de la célula, en algunos casos puede participar de otras funciones. Por ejemplo, en células de hígado sirve para catabolizar pro-

teínas del plasma, en fagocitos interviene en la respuesta inmunológica, y en los pulmones participa en la limpieza de las cavidades alveolares. La autofagia está relacionada con la diferenciación y adaptación celular, con la renovación de componentes de la célula y con la supervivencia de la célula en condiciones de ayuno.

Existen muchas enfermedades causadas por algún fallo en la función del lisosoma. A nivel celular, estos estados patológicos pueden dividirse en tres síndromes principales: en primer lugar, la *descarga intracelular* del contenido lisosomal. Si ésta se produce, las enzimas hidrolíticas del lisosoma se esparcirán en el citoplasma, dañando su estructura y provocando la muerte de la célula. En segundo lugar, la *descarga extracelular* del lisosoma puede dañar tejidos circundantes, especialmente tejido óseo y conectivo. Por último, la *sobrecarga* e hinchamiento de este orgánulo puede provocar la compresión y atrofia de orgánulos circundantes.

La descarga intracelular puede estar provocada por distintas causas: sustancias inorgánicas, como la sílice, pueden dañar la membrana de los lisosomas; también algunas toxinas bacterianas, drogas lisosomotrópicas o sustancias orgánicas, como esteroides y terpenos, pueden provocar el mismo efecto. La sobrecarga de lisosomas puede

estar provocada por la asimilación de sustancias indigestibles, como el dextrano y la polivinilpirrolidona; por el exceso de sustancias digestibles o de productos de digestión y también por la carencia de algún enzima hidrolítico en el interior de estos orgánulos. A este último caso pertenece una larga lista de enfermedades, como, por ejemplo, la enfermedad de Pompe, que se produce por acumulación de glucógeno en el lisosoma debido a que no existe el enzima hidrolítico correspondiente.

Los lisosomas constituyen el blanco de muchos fármacos diferentes. Estos fármacos pueden introducirse en el orgánulo por endocitosis y también pueden penetrar directamente la membrana como especies neutras, las cuales adquieren carga positiva en el interior y quedan atrapa-

das por la selectividad de la membrana lisosomal. La actividad digestiva de los lisosomas puede emplearse para construir complejos «portadores de fármacos». Estos complejos deberían poseer señales específicas que permitiesen su entrada por endocitosis sólo en algunos tipos de células (por ejemplo, en células cancerosas). Una vez en el interior, el fármaco pasaría al lisosoma donde se liberaría ejerciendo su acción. Lo importante es que esta acción no tendría efecto sobre las demás células del organismo.

Por último, cabría destacar que todas estas aplicaciones no son el producto de una planificación. Surgieron, como consecuencias maravillosas aunque impredecibles, de una investigación básica, cuyo único objetivo era comprender mejor la estructura de las células vivas.

Manuel Serrano Ríos

«DESCUBRIMIENTOS EN LA ESTRUCTURA SUBCELULAR»

La vida científica del doctor De Duve es la dedicación al conocimiento íntimo de la estructura subcelular y de la significación funcional de los múltiples «microcuerpos celulares» que existen en el citoplasma celular. En 1955, con Novikoff, visualizó unas partículas nuevas, que había descubierto diez años antes, y para las que acuñó definitivamente el término de *lisosomas*. Estos representan un papel fundamental en la defensa frente a infecciones, en la nutrición, modulación endocrina y equilibrio entre la producción y destrucción del hueso, así como en muchos procesos claves del metabolismo celular y tisular. El



descubrimiento de los lisosomas supuso un formidable impulso para los investigadores de todos los países, que se lanzaron al mundo fascinante de los microcuerpos celulares. En 1965 De Duve y sus colaboradores descubrieron una nueva especie, también heterogénea, de orgánulos: los *peroxisomas*, con múltiples variantes, que pueden ser también utilizados en terapéutica. De Duve y su grupo, junto a Palade, Novikoff, Brachet, Claude y otros, han revolucionado la escena, relativamente vacía de la célula, estimulando y enriqueciendo la investigación en Biología Celular.

«ADN Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS»



El conocimiento, a nivel molecular, de las enfermedades genéticas tuvo su origen en el estudio de ciertas disfunciones relacionadas con la estructura de la hemoglobina, principalmente talasemias y anemia falciforme. En los últimos años, el estudio de estas enfermedades ha avanzado considerablemente gracias al desarrollo de técnicas de ADN recombinante, que nos permiten analizar directamente el ADN humano.

Las herramientas principales que nos suministra esta tecnología consisten en: 1) Un método para cortar y pegar fragmentos de ADN; las endonucleasas de restricción cortan secuencias específicas dentro de la cadena de ADN, y el enzima ligasa permite la unión de diversos fragmentos; 2) Un método para obtener en grandes cantidades una sola molécula de ADN, fenómeno conocido como clonaje; y 3) Un método que permita comparar fácilmente el grado de homología de secuencia entre distintas muestras de ácidos nucleicos. Esta técnica, llamada hibridación, es especialmente importante en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, ya que nos permite distinguir entre genes normales y anormales.

Volviendo al ejemplo de la hemoglobina, existen varios tipos de mutaciones que provocan talasemias. Los pacientes que sufren esta enfermedad no son capaces de producir ninguna de las subunidades de esta

proteína o producen subunidades no funcionales, presentando severos síntomas de anemia. Estas mutaciones pueden deberse a deleciones del material genético, sustituciones de bases que provocan un cambio en la fase de la lectura, mutaciones que impiden el procesamiento del ARN mensajero o provocan un procesamiento incorrecto, así como cambios en la zona reguladora del gen que dan lugar a bajos niveles de transcripción.

Actualmente existe una larga lista de enfermedades cuyo origen genético está comprobado, tales como la hemofilia, la hipercolesterolemia familiar, la deficiencia en hormona del crecimiento o la fenil-cetonuria. Todas ellas se deben a mutaciones semejantes a las mencionadas.

Diagnóstico prenatal

La prevención de las enfermedades hereditarias incluye medidas a diferentes niveles. Un primer nivel consiste en el control de los agentes mutagénicos; en segundo lugar, es posible estudiar los antecedentes familiares; el tercer nivel implica realizar búsquedas, mediante técnicas de laboratorio, de genes anormales, bien sea entre la población adulta (portadores de genes alterados pero que no presentan síntomas), bien por diagnóstico prenatal o bien en recién nacidos. El diagnóstico prenatal se ha venido haciendo hasta ahora mediante amnio-

centosis, ecografía o fetoscopia; análisis que se realizaba hacia los seis meses del embarazo. Ultimamente se tiende a emplear técnicas más precoces, basadas en la extracción de células vellosas del córion y en el análisis del ADN obtenido de estas muestras.

En general, la identificación de enfermedades genéticas mediante técnicas de análisis de ADN nos permite poner de manifiesto alteraciones cromosómicas, mutaciones en un gen único, algunas malformaciones congénitas, así como la predisposición a contraer enfermedades vasculares, diabetes, psicosis y enfermedades de respuesta autoinmune.

Existen indicios de que en un futuro puedan llegar a corregirse estas enfermedades median-

te terapia genética. Esta terapia se basaría en introducir en las células del individuo enfermo los genes normales, conseguir que estos genes se expresen y, lo que es más difícil, lograr un tipo de regulación adecuado.

Con este fin se están considerando distintas estrategias. En primer lugar, la introducción directa de ADN en las células implicadas en la enfermedad. En segundo lugar, se ha pensado utilizar retrovirus como vectores, método éste, que ha funcionado bien en cultivos celulares. También se ha intentado la inserción de ADN mediante recombinaciones homólogos, aunque con muy baja eficiencia. Otras vías consisten en la reactivación de los genes fetales y la inserción de material genético en células germinativas.

César Milstein

«PIONERO EN EL ESTUDIO DE LAS TALASEMIAS»



Uno de los grandes triunfos de la biología molecular ha sido el descubrimiento de las bases moleculares de ciertas enfermedades hereditarias. El profesor Weatherall ha sido uno de los grandes pioneros en el estudio de un grupo de anemias conocido con el nombre de Talasemias, en las que los cambios en el material genético son más comunes, drásticos y más difíciles de definir que en otros tipos. En general, involucran la pérdida total de la capacidad del organismo de sintetizar alguna de las cadenas que constituyen la hemoglobina. Cuando el organismo tiene la capacidad de sustituir esa cadena por otras, el individuo afectado sobrevive, pero el precio es un proceso ané-

mico que suele mostrarse en la infancia.

Los motivos por los cuales se producen esas anomalías son variados y se refieren al control de las síntesis de la proteína y sus precursores. Pero en todos los casos, llevan aparejados cambios en el ADN.

Existe la esperanza de poder diagnosticar casos en los primeros estadios del embarazo, y ello se puede hacer en determinadas anemias y en algunos otros casos. Los estudios en esta dirección, en los que el doctor Weatherall ha tenido un papel prominente, proveen las bases científicas para la prevención de muchos desórdenes congénitos. ■