



REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE VALENCIA

**LA BIOTECNOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS  
Y DE LOS ÁCIDOS NUCLÉICOS, PUNTOS CLAVES  
PARA EL FUTURO DE LA MEDICINA**

DISCURSO DE RECEPCIÓN

DEL ACADÉMICO ELECTO

**ILMO. SR. DR. D. JESÚS CALDERÓN GÓMEZ**

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

DEL ACADÉMICO NUMERARIO

**ILMO. SR. DR. D. JUAN ESPLUGUES REQUENA**

LEÍDOS EL 16 DE MAYO DE 1995

VALENCIA

MCMXCV

Excmo. Sr. Presidente,  
Ilmos. Srs. Académicos,  
Señoras y Señores:

ES NORMA TRADICIONAL para solemnizar actos como el que estamos celebrando, que el nuevo miembro, inicie su intervención en esta Academia con palabras de agradecimiento, por el honor otorgado al ser acogido a ella.

Yo cumplo gustosísimamente con este precepto, que en mi caso no es mero acto ritual de cortesía. Estoy plenamente convencido que en esta elección, vuestra benevolencia y generosidad han pesado más que los méritos de mi modesta labor científica, hecho este, que hace indudablemente que mi deuda de gratitud con esta Corporación sea de difícil satisfacción para mí.

Permítanme que mi gratitud hacia todos y cada uno de los miembros de esta Academia, sea especialmente sentida hacia su Presidente y hacia los Profesores Francisco Gomar, Francisco Esteve y Juan Esplugues, que avalaron la propuesta de mi persona para ocupar esta plaza.

En los momentos estelares de nuestra vida, es de justicia el recordar y distinguir a todas aquellas personas, que en el cumplimiento de su deber, nos transmitieron generosa y desinteresadamente todo su saber y experiencia, contribuyendo en gran manera a marcar y orientar nuestro futuro.

Por eso, mi reconocimiento a los Profesores Llombart Rodríguez, Valdés Ruiz, García-Conde Gómez, Gomar Guarner, Carbonell Antolí, Smith

Agreda, Esplugues Requena, Colomer Sala, López Piñero, Viña Giner, Gisbert Calabuig y Carreras Matas. Un recuerdo especial a los profesores recientemente fallecidos Sanchis-Bayarri Lahoz, Bonilla Martí y Galbis Pascual. A todos ellos, hace relativamente poco tiempo mis maestros y profesores en esta Facultad, quiero decirles que hoy tendré el honor de compartir con ellos, un sillón en esta Academia.

También mi reconocimiento al Profesor Viña Giner, con quien inicié hace ya muchos años, el trabajo de laboratorio.

Mi gratitud y emocionado recuerdo a los Profesores Francisco Vivanco y Francisco Ramos, con quienes tuve la suerte de trabajar en el Departamento de Hormonas y Nutrición de la Fundación Jiménez Díaz. Su rigor científico y humano fueron fundamentales y decisivos en mi formación.

Mi reconocimiento y admiración al Profesor Llombart Bosch por la fecunda colaboración que a través del Convenio Universidad Empresa, venimos desarrollando a lo largo de varios años.

También quiero recordar y agradecer al Profesor Cabo Soler su dedicación y entrega en la dirección de mi Tesis Doctoral.

En momentos tan emotivos, no puedo olvidar al Profesor Santiago Grisolia, con quien vengo colaborando a lo largo de los 14 años de existencia de la Fundación Valenciana de Estudios Avanzados; su experiencia, sus conocimientos y en definitiva su magisterio, han sido fundamentales para mí, en algunas facetas de mi vida.

Permítanme también, ya dentro de los afectos familiares, mi recuerdo y mi cariño a quienes durante estos años estuvieron junto a mí y a cuyo ejemplo, dedicación y paciencia, debo en gran parte, el estar hoy aquí.

En primer lugar a mi padre, el Dr. Jesús Calderón Miguel, quien supo desde su hidalguía castellana y hombría de bien, mostrarme el camino de la rectitud y el trabajo como guía de mis pasos. A mi madre, que supo aunar sus raíces argentinas con la dulzura valenciana, para ser la mujer fuerte de la Biblia y la guía de mi juventud

y madurez. A mi mujer y mis hijos que han supuesto no sólo la continuidad de mi labor, sino la razón de sentirme cada vez más unido a estas tierras, donde recalé hace ya muchos años.

También mi reconocimiento y gratitud a todos mis colaboradores a lo largo de estos años, tanto en el laboratorio como en la farmacia, cuya ayuda ha sido inestimable para mí. A ellos una vez más mi profundo agradecimiento por la labor desarrollada.

Finalmente y de manera muy especial me dirijo al Profesor Juan Esplugues Requena para mostrarle mi profundo agradecimiento por el honor que me ha concedido al aceptar el encargo de la Academia para contestar a mi discurso de ingreso. Agradecimiento muy sentido a quien fue mi maestro en esta Facultad y de quien recibí no solo su magisterio en el campo de la Farmacología, sino también su continuo ejemplo del saber científico y talante Universitario.

\*\*\*

## **Introducción**

La evolución que ha experimentado el laboratorio clínico en las últimas décadas, al igual que la que ha tenido lugar en otras ramas de la medicina, no tiene parangón con la de ningún otro periodo de la historia.

Cuando al comienzo de los años 50, los médicos de mi generación iniciamos nuestra andadura en este campo de la medicina, asistíamos al final de una época, en la que los métodos analíticos clásicos habían permanecido estables durante muchos años y sin saberlo estábamos presenciando el nacimiento de una nueva era, en la que los logros conseguidos eran entonces impensables.

La investigación básica en ciencias fundamentales como la física y la química, ha sido en buena parte la responsable del gran desarrollo de la

bioquímica, de la genética, de la hematología y de la inmunología, ciencias que hoy constituyen el soporte fundamental del laboratorio clínico.

Para conocer la magnitud del cambio experimentado, he seleccionado el estudio de algunos de los aspectos más señalados de las dos moléculas más importantes de la vida: **las proteínas y los ácidos nucleicos**.

Como muy bien dicen Quira y Cadenas, los ácidos nucleicos son las moléculas que programan lo que los seres vivos son y lo que pueden hacer, pero la puesta en escena corresponde a las proteínas, de las cuales depende el éxito del organismo en el mundo altamente competitivo en el que nos ha tocado vivir.

Desde 1905, gracias a los trabajos del alemán Fischer, se sabe que las proteínas son macromoléculas formadas por largas cadenas de alfa-1-aminoácidos que se unen por enlaces peptídicos para formar un polipéptido.

El número exacto de aminoácidos diferentes que entran en la composición de las proteínas quedó aclarado definitivamente en 1940 cuando se vio que la totalidad de las proteínas estudiadas se componían de 20 aminoácidos distintos. Lo que sucede es que la proporción y el número de cada uno de ellos es diferente en cada proteína y cada proteína se caracteriza por el número y la secuencia de sus aminoácidos, tal como demostró en 1951 Frederik Sanger al dar a conocer la secuencia de aminoácidos de una de las cadenas polipeptídicas de la insulina.

Estos 20 aminoácidos se unen entre sí en un número prácticamente ilimitado de combinaciones diferentes, imprimiendo de esta manera no sólo a los seres vivos, sino también a muchas de sus estructuras, un sello característico y distintivo, como expresión de sus ilimitadas potencialidades.

La unión de los diferentes aminoácidos para la síntesis de la cadena polipeptídica tiene lugar en los ribosomas del citoplasma, pero la información que determina la secuencia de los mismos, procede del ADN de los cromosomas y más concretamente del ARN mensajero. Esta unión de los aminoácidos, tiene lugar, de tal manera, que cada

enlace peptídico condiciona un plegamiento de la cadena, plegamiento determinado por las fuerzas eléctricas que convergen en el enlace peptídico y por las débiles uniones que se establecen entre los grupos laterales de los aminoácidos.

Como consecuencia de los numerosos plegamientos de la cadena, las proteínas adquieren una configuración tridimensional en el espacio, de la cual van a depender muchas de sus propiedades, incluidas las biológicas.

De métodos rudimentarios y simples, como el de las botellas de sulfato de cobre, generalizado en una buena parte de los laboratorios de aquella época en la cuantificación de las proteínas plasmáticas, se ha llegado en los momentos actuales a poder establecer la secuencia de aminoácidos de una proteína sin haber sido aislada, a poder conocer su configuración espacial, y a poder cuantificar con exactitud y gran sensibilidad numerosas proteínas de gran interés clínico y biológico.

Vamos a comentar muy brevemente los principales avances conseguidos a lo largo de estos años en la cuantificación de proteínas en la práctica del laboratorio clínico.

Por orden cronológico, destacamos en primer lugar la llegada a España al comienzo de los años 50 de los primeros fotocolorímetros, que aunque rudimentarios y simples, permitieron la cuantificación de las proteínas plasmáticas por técnicas colorimétricas específicas como la del "Biuret".

En un principio, tuvieron transcendencia los métodos fisicoquímicos como la ultracentrifugación y la electroforesis, muy útiles, sobre todo en el aislamiento y fraccionamiento de proteínas.

La ultracentrifugación, descubierta por los científicos suecos Svedberg y Pedersen, se funda en las diferentes densidades de las proteínas y por consiguiente en las diferentes velocidades de sedimentación al someterlas a la acción de una fuerza centrífuga intensa. Nunca ha sido un método idóneo para el estudio de las proteínas plasmáticas por su pobre resolución; por el contrario, ha sido muy útil en el

estudio de las lipoproteínas, que como todos Vds. conocen, se han clasificado con arreglo a su comportamiento en la ultracentrifugación de acuerdo con sus diferentes densidades.

La ultracentrifugación resulta interesante en la investigación básica, en la determinación del peso molecular de las proteínas.

La electroforesis, descubierta en 1937 por Tiselius, discípulo de Svedberg, se funda en que las proteínas, portadoras de carga eléctrica, al ser sometidas a la acción de un campo eléctrico, se desplazarán hacia el ánodo o hacia el cátodo a una mayor o menor velocidad según su carga eléctrica y la intensidad del campo eléctrico que sobre ellas actúa.

Cuando fue descubierta en 1937, la electroforesis se realizaba en fase líquida libre y no fue hasta 1950, al introducir el papel de filtro como soporte, cuando encontró aplicación práctica en el laboratorio clínico, al permitir la lectura de las bandas y por consiguiente la cuantificación de las diferentes fracciones protéicas del suero.

La electroforesis desplazó al fraccionamiento salino de las proteínas con sulfato sódico, sulfito sódico y sulfato amónico, hoy reservado a los laboratorios de enzimología para el aislamiento y purificación de enzimas.

¿Cuán lejos estaría Tiselius de poder imaginarse que su electroforesis en "gel de agarosa" jugaría un importante papel en las técnicas del ADN recombinante en el último tercio del siglo?

Una propiedad común a todas las proteínas, es el poder de unión selectivo con determinadas moléculas, propiedad que ha sido utilizada como punto de partida de numerosas e interesantes técnicas para su cuantificación.

Esta afinidad puede tener lugar entre moléculas protéicas idénticas, dando lugar a estructuras moleculares de mayor tamaño, como es el caso de las proteínas estructurales. La mayor parte de las veces, esta afinidad tiene lugar entre moléculas diferentes, que pueden ser protéicas como en el caso de la unión antígeno-anticuerpo, o no

protéicas, como la unión enzima-substrato, como la unión de la hemoglobina con el oxígeno o la unión de los receptores de membrana con hormonas o con otros ligandos.

En este sentido destacamos la gran importancia de las uniones antígeno-anticuerpo y enzima substrato, fundamento y soporte de las dos tecnologías de mayor interés en los momentos actuales en la cuantificación de proteínas. Me estoy refiriendo a **las técnicas inmunológicas** y a las **técnicas enzimáticas** respectivamente.

### **Técnicas inmunológicas**

En términos generales se puede afirmar que la reacción antígeno-anticuerpo produce un complejo molecular con propiedades ópticas definidas y aprovechables con fines analíticos, bien sea midiendo la luz que transmite o midiendo la luz que difunde, fundamentos de la turbidimetría y nefelometría respectivamente. Con base en estos principios se dispone hoy de tecnología y aparataje para cuantificar proteínas de interés clínico y biológico con exactitud y sensibilidad.

Otras técnicas inmunológicas de interés son la inmunolectroforesis, descrita por Grabar y Williams en 1954, la inmunodifusión radial, descrita por Ouchterlony en 1959, la inmunosubstracción y la inmunolectroforesis bidimensional. En algunas de estas técnicas se combinan la separación electroforética y la precipitación inmunológica.

Dentro de las técnicas inmunológicas merece un comentario el **Radioinmunoanálisis** (RIA), técnica que aparece al final de la década de los años 50, como respuesta a la urgente necesidad de valorar cuantitativamente sustancias que se encuentran en los fluidos biológicos en concentraciones muy bajas y acompañadas de otras, que potencialmente pueden producir interferencias. Se planteó el doble reto de encontrar una técnica altamente sensible y específica.



El problema fue resuelto por R.S. Yallow y S.A. Berson, quienes en 1959 publican un método para cuantificar insulina en plasma humano. El método se funda en unos principios que básicamente consisten, en añadir a la muestra una determinada cantidad de la misma sustancia que se pretende valorar, pero marcada radioactivamente y en hacer reaccionar la mezcla con un antisuero específico. Se separa el complejo antígeno-anticuerpo formado y se mide la radioactividad del mismo. Dado que la sustancia añadida y marcada es inmunológicamente idéntica a la sustancia problema no marcada y presente en el plasma, ambas reaccionan con el anticuerpo en cantidades proporcionales a sus respectivas concentraciones, de tal manera, que a una baja concentración del problema corresponde una alta radioactividad del complejo y viceversa.

Este método enseguida se generalizó con gran éxito en la cuantificación de proteínas, aunque tropezó al principio con notables dificultades en su aplicación a las hormonas esteroideas, por falta de antisueros específicos y por una estructura química muy similar entre ellas, que puede dar lugar a interferencias importantes. Ambos problemas se solucionan al unir cada una de estas hormonas a proteínas diferentes (haptenos) que permitió la obtención de anticuerpos específicos para cada una de ellas.

La técnica mejoró considerablemente con la llegada de los anticuerpos monoclonales.

Esta técnica, genialmente concebida por Rosalyn Yallow, galardonada con el Premio Nobel, es capaz de cuantificar concentraciones del orden del ng., pg., y fg. en un ml., concentraciones un millón, mil millones, y un billón de veces respectivamente menores que las de otros compuestos clásicos como pueden ser la glucosa, la urea y otros parámetros bioquímicos.

La técnica se difundió rápidamente y cada vez con mayor aceptación, únicamente limitada por las implicaciones de tipo legal secundarias al uso de materiales radioactivos.

Estos problemas movieron a las grandes empresas a modificar el método para evitar estos inconvenientes. Con tal motivo nace el **Enzimoimmunoanálisis** (EIA), cuyo fundamento es idéntico, con la única diferencia de que el marcaje es con un enzima en lugar del trazador radioactivo.

Tanto el RIA como el EIA han encontrado un gran campo de aplicación en la valoración de hormonas, marcadores tumorales, marcadores víricos, proteínas transportadoras, receptores hormonales, drogas, fármacos y otros muchos compuestos de interés clínico y biológico.

### **Técnicas enzimáticas. Enzimología clínica**

La enzimología clínica, hoy imprescindible en el diagnóstico y seguimiento de numerosas enfermedades cardíacas, hepáticas, musculares, pancreáticas, óseas y tumorales, nace muy precariamente en el primer tercio del siglo con la determinación de la diastasa por Rona en 1924 y por Somogyi en 1938 y con las determinaciones de las fosfatasa ácidas y alcalinas por Bodansky en 1932.

Va a ser necesario un gran descubrimiento y el transcurso de unos cuantos años para que la "enzimología clínica" inicie y adquiera el apogeo e interés que tiene en estos momentos.

Me estoy refiriendo al descubrimiento de Warburg en 1936 del "test óptico" que lleva su nombre y que como en otras muchas ocasiones fue producto de la investigación básica.

En 1936, Warburg al demostrar que la oxidación y reducción de los coenzimas  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  pueden seguirse perfectamente por los cambios que tienen lugar en la absorción de la luz ultravioleta a 340 nm., marca el punto de partida y sienta las bases de lo que en el transcurso de unos años va a ser la "enzimología clínica".

Las formas reducidas de ambos nucleótidos presentan un pico de absorción máxima a 340 nm., mientras que las formas oxidadas presentan una absorción mínima a esta misma longitud de onda.

Fue al comienzo de los años 60, cuando se inicia en España la "enzimología clínica", coincidiendo con la llegada de los primeros espectrofotómetros de luz ultravioleta con mando selectivo de longitud de onda; eran de la marca Beckman y Unicam y eran muy pocos los laboratorios que en aquellas fechas disponían de algunos de estos dos modelos.

Con fundamento en el "test óptico" de Warburg, hoy se valoran todos aquellos enzimas y substrato en cuyas reacciones participan directa o indirectamente los nucleótidos citados. La técnica es cómoda, sencilla, exacta, sensible y susceptible de ser automatizada.

A título de curiosidad, les diré que en 1946, el descubrimiento de Warburg es genialmente interpretado por Severo Ochoa para llevar a cabo uno de sus primeros grandes descubrimientos: la fijación del CO<sub>2</sub> por la célula animal, privilegio que hasta entonces se creía privativo de la célula vegetal de las plantas verdes, en su función clorofilica.

Este descubrimiento de escasa proyección práctica, pero muy grande bajo un punto de vista teórico y conceptual, tiene lugar al estudiar la descarboxilación oxidativa del isocítrico a alfa-cetoglutárico y CO<sub>2</sub>, reacción catalizada por la isocítrico deshidrogenasa en presencia del nucleótido NADP<sup>+</sup> y de iones de magnesio o manganeso.



La reacción es seguida de acuerdo con el "test óptico" de Warburg, por los cambios en la absorción de luz a 340 nm., cambios, que al hacer burbujear CO<sub>2</sub> en la cubeta del espectrofotómetro ponen de manifiesto la reversibilidad de la reacción y por consiguiente la fijación del CO<sub>2</sub> fuera de las plantas verdes.

Algunos años después, se confirman plenamente los trabajos de Ochoa, con el empleo de marcadores radioactivos y viendo como el

CO<sub>2</sub> marcado se incorpora al grupo carboxílico del ácido orgánico, tal como había sospechado.

Independientemente de los cambios en la absorción de la luz ultravioleta, la enzimología clínica, utiliza otras metódicas para medir la velocidad de la reacción enzimática y por consiguiente para la cuantificación de enzimas y substratos. Estos métodos son: colorimétricos, fluorimétricos, volumétricos y electroquímicos.

### **Hemoglobina**

Entre las numerosas proteínas, he seleccionado el estudio de la molécula de hemoglobina por los interesantes y perfectos mecanismos moleculares que regulan su función y por ser a la vez una de las proteínas de mayor significado en nuestra economía. Su molécula está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos alfa de 141 aminoácidos y dos beta de 146. Estas cuatro cadenas se unen entre sí dando lugar a la estructura cuaternaria. Cada una de estas cadenas contiene un grupo "hemo", que es un anillo porfirínico con un átomo de hierro en el centro.

Como dato curioso les diré que cada hematíe contiene aproximadamente 270 millones de moléculas de hemoglobina y que cada molécula transporta cuatro moléculas de oxígeno, una en cada uno de los cuatro "grupos hemo".

En el transcurso de estos años, hemos pasado del uso, del simple y rudimentario hemoglobínómetro de Salhi para cuantificar la hemoglobina a conocer su estructura tridimensional en el espacio, gracias a los interesantes trabajos de M.F. Perutz, en los que invirtió 25 años de su vida, y por los que fue galardonado con el premio Nobel.

Para explicar el comportamiento de algunas proteínas entre las que se encuentran la hemoglobina y numerosos enzimas, es necesario el carácter flexible de su estructura, que dará lugar a cambios en la

configuración espacial y por consiguiente a variaciones en su actividad biológica, orientadas a un mejor desarrollo de su función.

La configuración espacial de la hemoglobina depende fundamentalmente de la secuencia de aminoácidos en sus cadenas polipeptídicas y en menor proporción de factores fisicoquímicos del medio como pH y temperatura. Cuando aumenta la demanda de oxígeno por parte de los tejidos bien sea por anemia, asfixia o exceso de trabajo, los cambios estructurales que tienen lugar en la molécula de hemoglobina, por el descenso del pH y temperatura, disminuyen su afinidad por el oxígeno, favoreciendo la cesión a los tejidos más necesitados.

De la misma manera el 2-3-difosfoglicerato de los hematíes actúa como regulador alostérico, de forma que al unirse preferentemente a la díoxihemoglobina, disminuye su afinidad por el oxígeno, facilitando de esta manera, lo mismo que en el caso anterior, la cesión del oxígeno a los tejidos más necesitados. El 2-3-difosfoglicerato es un metabolito de la glucosa, derivado del 1-3-difosfoglicerato en una desviación de la vía glucolítica principal. Se ha demostrado que la concentración de este metabolito en los hematíes de los mamíferos es muy variable y siempre es la más adecuada para que la función de la hemoglobina se lleve a cabo con la máxima eficacia.

Estos cambios estructurales en la molécula de la hemoglobina, que modifican su afinidad por el oxígeno, de acuerdo a las necesidades de los diferentes tejidos, constituye un alarde verdaderamente prodigioso de las posibilidades de la "biología molecular" a límites insospechados de perfección.

Entre situaciones extremas como la determinación de la hemoglobina con el hemoglobinómetro de Salhi y la investigación de su configuración espacial, hoy fuera del alcance y posibilidades del laboratorio clínico, hay otras facetas verdaderamente interesantes.

Me estoy refiriendo al interés clínico que tienen la determinación de algunos de los enzimas que como el ALA-dehidrasa intervienen en la biosíntesis del "grupo hemo" de la hemoglobina y a la determinación de los principales metabolitos intermediarios de dicha vía metabólica,

determinaciones que ya son desde hace años, técnicas de rutina en muchos laboratorios clínicos. Se debe tener en cuenta, que estos parámetros son fundamentales en el diagnóstico y seguimiento de la "enfermedad reina" de las enfermedades profesionales: **el saturnismo**, hoy, afortunadamente, en franca decadencia.

La determinación de estos metabolitos intermediarios como ácido delta-aminolevulínico, coproporfirinas y zinc-protoporfirina eritrocitaria, entran en la rutina diaria de nuestro laboratorio desde el comienzo de la década de los años 70, sobrepasando ya las 100.000 determinaciones, lo que comprenderán fácilmente al saber que a lo largo de estos años hemos controlado en plan asistencial a la mayor parte de los 10.000 trabajadores de la industria cerámica de Castellón y provincia.

El estudio estadístico y médico de los resultados obtenidos en estos controles fue la base de nuestra tesis doctoral.

Para nuestro estudio, seleccionamos tres parámetros: plomo y zinc-protoporfirina eritrocitaria en sangre y la actividad mieloperoxidásica en los polinucleares neutrófilos. Elegimos el plomo y la zinc-protoporfirina eritrocitaria por ser los dos parámetros más representativos de la impregnación plúmbica y la actividad mieloperoxidásica en neutrófilos, porque creíamos que su estudio podría resultar interesante en el saturnismo, ya que su molécula es portadora de dos grupos "hemo", cuya biosíntesis podría ser inhibida por los mismos motivos y por los mismos factores que lo es la del "hemo" de la hemoglobina. También nos animó a este estudio, los interesantes trabajos de Cook en 1974 y 1975 en los que demuestra un descenso de la actividad fagocitaria "in vivo" en ratas tratadas parenteralmente con plomo y los de Kenent y col. en 1979 que demuestran un descenso de la actividad del enzima en perros a los que se les había administrado plomo por vía oral.

De las numerosas e interesantes conclusiones obtenidas, sólo voy a comentar la que considero más importante del trabajo: el haber establecido matemáticamente los niveles mínimos de plumbemia capaces de producir una lesión molecular y por lo tanto una patología a nivel de la biosíntesis del grupo "hemo" de la hemoglobina.

Por el contrario, nuestros resultados no demostraron variación alguna en los niveles de actividad mieloperoxidásica de los neutrófilos a los niveles de plumbemia en que tiene lugar la inhibición de la biosíntesis del "grupo hemo" de la hemoglobina. Una explicación posible de nuestros resultados, es que más del 95% del plomo de la sangre, se transporta en los hematíes, por lo que es lógico pensar, que a niveles moderados de plumbemia únicamente se afecte la síntesis del "hemo" a nivel de los hematíes y no de los leucocitos.

Nuestras discrepancias con los trabajos de Cook y Kenent, creo que radican en que los niveles de plumbemia en la experimentación animal son notablemente más altos que los del hombre expuesto al plomo en los ambientes laborales en estos tiempos.

El futuro de la investigación en el campo de las proteínas se centra fundamentalmente en la "Biología Molecular". Fue al comienzo de los años 40, cuando W.T. Asbury, pionero en el empleo de las técnicas de difracción con rayos X en el estudio del estado cristalino, el que habla por primera vez de "Biología Molecular". Pero es a comienzos de la década siguiente, cuando esta ciencia adquiere su mayoría de edad, como consecuencia de las transcendentales aportaciones de Fred Sanger en 1951 con su método para secuenciar aminoácidos y de J. Watson y F. Crick con su genial descubrimiento de la estructura y funciones del ADN en 1953.

Si la secuencia de aminoácidos en la molécula protéica determina su configuración espacial, de la que depende gran parte de la actividad biológica, es lógico, el interés existente desde hace algunos años en establecer la secuencia y la orientación espacial de las proteínas, en un intento de llegar a conocer la posible relación existente entre secuencia, configuración y actividad biológica.

En los momentos actuales, es relativamente fácil en centros especializados, el establecer la secuencia de aminoácidos de una proteína; más complicado, pero posible, resulta conocer su configuración espacial. A pesar de estas posibilidades, resulta complicado aún, el poder predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir

de la secuencia de sus aminoácidos, o lo que es lo mismo, establecer la secuencia de aminoácidos para obtener una proteína de propiedades y características preestablecidas, lo que equivaldría a la síntesis de proteínas a medida.

Lo que si es posible mediante técnicas de mutagénesis dirigida, alterar la secuencia de aminoácidos de una proteína en la forma deseada con el fin de ver la posible repercusión de estos cambios en su estructura espacial y en sus propiedades biológicas. Lo mismo que se hace cuando modificamos determinados grupos funcionales en una molécula orgánica para ver la repercusión en su actividad terapéutica.

Potentes ordenadores guardan en sus memorias los resultados y datos procedentes de numerosos centros, en un intento de llegar a obtener conclusiones en un próximo futuro sobre la posible relación entre secuencia de aminoácidos, configuración espacial y actividad biológica.

### **Acidos nucléicos. De Mendel a la tecnología del ADN recombinante**

Cuando fueron controlados en generaciones sucesivas los cruzamientos entre individuos con caracteres bien definidos, fue posible conocer como se transmitían estos caracteres.

El primero en intentarlo y conseguirlo fue el fraile agustino Gregorio Mendel, hoy considerado padre de la genética y uno de los grandes genios de la humanidad. Ingresó en el Convento de Agustinos de Brunn en Alemania en 1843, en cuyo jardín realiza una serie de interesantes trabajos, que permanecieron en el más completo silencio durante más de 50 años, redescubiertos a principios de siglo, fueron el punto de partida de una de las ciencias de más brillante porvenir: **la Genética.**

Mendel, estudiando la transmisión hereditaria de los caracteres que diferenciaban a unas variedades de guisantes, como el tamaño del tallo, semillas blancas y amarillas, lisas y rugosas, tras sucesivos cruzamientos, analiza los resultados obtenidos a lo largo de varios años y llega a interpretar una de las leyes más fundamentales de la naturaleza: **los caracteres**



**hereditarios son transmitidos a la progenie como unidades independientes.** Intuye genialmente que cada guisante tiene un par homólogo de cada una de estas "unidades hereditarias" para cada carácter, de las cuales una procede del padre y la otra de la madre.

Cuando en 1884 muere Mendel, ya se sabía que la cromatina del núcleo está formada por unos pequeños filamentos, llamados cromosomas, pero nada se conocía acerca de su funcionalidad.

A principios de siglo, ya se intuye que los cromosomas son el soporte de las leyes de Mendel, se admite que en los individuos de una misma especie el número de cromosomas es constante y que los cromosomas de una misma célula se diferencian en el aspecto y en el tamaño y que cada cromosoma está duplicado, uno procede del padre y el otro de la madre.

En 1902 se admite que los cromosomas son los portadores de la herencia.

En 1909, aparece por primera vez la palabra gen, posteriormente identificados con las unidades hereditarias de Mendel.

En 1910, se admite que cada gen tiene una localización fija en un cromosoma determinado.

En 1913, se admite la ordenación lineal de los genes en el cromosoma y tiene lugar el intento de conseguir el primer mapa genético.

En 1905, Stevens y Wilson, descubren los cromosomas sexuales y demuestran que el cromosoma X está duplicado en las mujeres, mientras que en los hombres, además del cromosoma X, tienen otro distinto, diferente, denominado Y. Los óvulos son siempre portadores de un cromosoma X, en cambio los espermatozoides pueden ser portadores bien de un cromosoma X o de un cromosoma Y. Según que el óvulo sea fecundado por un cromosoma X o Y, el producto de la concepción será una hembra o un varón.

Es necesario llegar al año 1956 para que Tipo y Levan en el Congreso Internacional de Genética Humana de Copenhague, demuestren que el genoma humano está formado por 23 pares de cromosomas.

En 1909, Archibald Garrod habla por primera vez de “errores innatos del metabolismo”, es decir, de enfermedades metabólicas hereditarias e intuye genialmente que estos trastornos son secundarios a la ausencia de un enzima por fallo de un gen. Es la primera vez que se habla de la posible relación existente entre un gen y un enzima. Es necesario llegar a 1940 para que Beadle y Tatum en sus trabajos sobre el moho del pan (*Neurospora*), demuestren de una manera concluyente que cada gen codifica una proteína, intuyen que cada gen es el portador de la información necesaria para la síntesis de una proteína.

En la década de los años 20 se intenta lograr el primer mapa de cromosomas con la localización precisa de cada uno de sus genes. Fue Thomas Morgan, el que más contribuyó a la realización de este proyecto. Eligió para sus trabajos la mosca del vinagre (*Drosophila*) por sus características particulares de ciclo de vida corto y genoma con sólo cuatro pares de cromosomas. Morgan a lo largo de este período de tiempo consigue el mapa genético completo para los cuatro cromosomas de la *Drosophila*, con la localización de cada uno de sus genes. Es probable que el mapa completo del “genoma humano” se consiga en un plazo aproximado de 5 a 10 años, algo más de 75 desde los trabajos iniciales de Morgan con la mosca del vinagre.

A lo largo de este periodo de tiempo, los genetistas limitan sus estudios y experiencias a organismos superiores, por eso los genes estudiados están relacionados con alteraciones morfológicas y funcionales.

A partir de los años 30, hay interés por parte de los bioquímicos, de llevar estos estudios al campo de los microorganismos, lo que lleva al descubrimiento de nuevos genes que controlan reacciones bioquímicas, que permiten conocer nuevas vías metabólicas y a establecer el orden en el que transcurren algunas de estas reacciones.

En este tiempo, también merecen mención especial los trabajos de Luria y Delbrück, que demuestran la naturaleza mutante de los bacteriófagos, principio y fundamento que posteriormente aclararía la resistencia de las bacterias a los antibióticos y la resistencia de las células cancerosas a la acción de los citostáticos en la quimioterapia actual.

A pesar de estos interesantes hallazgos, la naturaleza molecular de los genes seguía en el más completo de los misterios, se consideraban como estructuras imaginarias necesarias para el desarrollo de algunos hechos concretos, nadie los había purificado, se representaban como cuentas de rosario situados en hipotéticas tiras relacionadas con los cromosomas.

Sin embargo los trascendentales trabajos de Fred Griffith en 1928 sobre la patogenicidad del *Diplococcus Pheumoniae*, causante de la pulmonía, fueron sumamente interesantes, al observar que al mezclar células patógenas, capsuladas y muertas por el calor con células vivas, no patógenas y desprovistas de cápsulas, una proporción de estas últimas se transforman en patógenas con su cápsula correspondiente. Esta observación es el punto de partida de dos hechos verdaderamente trascendentales, ya que al descubrir este bacteriólogo inglés el "principio mutante" del neumococo, inicia sin saberlo, por una parte la manipulación genética, punto de partida de lo que sería la "ingeniería genética" en la década de los años 70, por otra pone en manos de Oswald Avery y sus discípulos el camino que les lleva a identificar el "principio mutante" del neumococo con el ADN.

A lo largo de 10 años de trabajo, Avery y col. llegan a la conclusión de que el "principio mutante" es el ADN. En un trabajo publicado en 1944 admite que el ADN es la molécula portadora de la herencia en las bacterias. A esta conclusión llega después de muchos esfuerzos, al ver que el "principio mutante" se destruye por la acción de una desoxirribonucleasa, enzima que cataliza la destrucción de la molécula del ADN; por el contrario no es alterado por la acción de enzimas proteolíticas que degradan las proteínas, proteínas que en este caso acompañan al ADN y a las que se les atribuía el ser portadoras de la herencia.

Este trabajo, no es admitido unánimemente, tiene bastantes detractores que siguen creyendo que el ADN es el soporte al que se unen las verdaderas proteínas de la herencia. Fue necesario el transcurso de 10 años más para dar completamente la razón a Avery, al admi-

tirse unánimemente que el ADN es la molécula portadora de la herencia en el hombre, animales, plantas y bacterias.

Como suele suceder la mayor parte de las veces, han sido las aportaciones escalonadas de varios investigadores las que han contribuido en gran manera al esclarecimiento definitivo de la estructura del ADN por J. Watson y F. Crick en 1953.

Ya en 1940, Linus Pauling y M. Delbrück, sugieren que para la duplicación de los genes es fundamental la síntesis de moléculas complementarias y que puede ser la propia superficie del gen la que sirve de modelo para la formación de dichas moléculas.

Los estudios llevados a cabo con microscopía electrónica, demuestran que la molécula del ADN es lineal, larga y con un diámetro aproximado de 2 nm., diámetro excesivo para una molécula de ADN con una sola fibra o cadena, lo que hace pensar que son dos las cadenas, enrolladas en direcciones opuestas, tal como parece vislumbrarse en los estudios de difracción con rayos X.

Cuando en 1951, Chargaff reanuda sus trabajos sobre la estructura del ADN, sabe que esta varía mucho de unas especies a otras y encuentra que en las especies estudiadas la proporción entre bases púricas y pirimídicas es constante y lo que es más importante, demuestra que las proporciones entre adenina y timina y de guanina y citosina son siempre las mismas.

En 1953, A. Tod, demuestra que la unión entre los nucleótidos es siempre la misma, una unión fosfodiésterica 5'-3'. Esta unión fosfodiésterica tiene lugar a través del ácido fosfórico al unir el carbono 5' de un nucleótido y el 3' del nucleótido siguiente, razón por la cual la estructura del ADN es lineal.

Fue el estudio de las fibras de ADN con las técnicas de difracción de Rayos X lo que más contribuyó al esclarecimiento de la estructura del ADN. Ya en 1938, W. Asbury, pionero en este tipo de trabajos, fue primero en obtener una fotografía de ADN con esta tecnología, pero no fue lo suficientemente nítida para sacar conclusiones impor-

tantes. Bastantes años después, en 1953, Rosalind Franklin, con las mismas técnicas de difracción de Rayos X, obtiene una magnífica fotografía con imágenes cruciformes típicas de hélices, de la cual Watson y Crick, llegan a la conclusión de que la estructura del ADN es una doble hélice con un diámetro aproximado de 2 nm. y demuestran que la hélice da una vuelta completa a lo largo de su longitud cada 34 armstrong con 10 nucleótidos por vuelta.

Watson y Crick, en un intento de establecer de manera definitiva la estructura molecular del ADN, trabajan con modelos atómicos tridimensionales, tratando de confirmar las interpretaciones de la famosa fotografía. Pronto llegan a la conclusión de que la cadena formada por la desoxiribosa y el ácido fosfórico está en la parte exterior de la escalera y las bases tanto púricas como pirimídicas forman los peldaños de la misma, de tal manera que pueden establecerse puentes de hidrógeno entre las bases de las dos cadenas opuestas. Estos puentes de hidrógeno son débiles, pero son lo suficientemente numerosos para mantener unidas las dos cadenas en condiciones fisiológicas. Son necesarias temperaturas muy próximas a los 100° C para su separación, circunstancia esta muy utilizada a nivel de laboratorio en las modernas técnicas del ADN recombinante.

En 1928, el mismo año de los interesantes y trascendentales trabajos de Fred Griffith sobre la patogenidad del *Diplococcus Pheumoniae*, otro bacteriólogo inglés, Alexander Fleming, con el descubrimiento de la penicilina inicia la era antibiótica. Este descubrimiento y el esclarecimiento de la estructura de la doble hélice, son probablemente los dos acontecimientos científicos más importantes del siglo.

Podrán comprender la importancia y transcendencia del ADN por las palabras de Watson que literalmente transcribo:

«Ninguna substancia es tan importante como el ADN. Es la molécula fundamental de la vida porque lleva en su estructura la información hereditaria que determina la estructura de las proteínas. Contiene las instrucciones que gobiernan el crecimiento y la división de las células y la diferenciación del huevo fertilizado en la multitud de células espe-

cializadas necesarias para la vida de las plantas y animales superiores. Y como admite un número prácticamente infinito de variantes químicamente intercambiables, el ADN ha sido la base del proceso evolutivo que ha generado los millones de formas distintas de vida que han ocupado la tierra desde la aparición de las primeras estructuras con vida hace tres mil o cuatro mil millones de años».

La extraordinaria capacidad de las variantes del ADN para organizar nuevas formas de vida con mayor aptitud para sobrevivir que sus antecesores inmediatos, ha hecho posible la aparición de nuestra propia especie, con capacidad para comprender la naturaleza de su entorno y para utilizar esa información en la construcción de las civilizaciones del hombre moderno.

Desde que se conoció la estructura del material genético en 1953, han tenido lugar toda una serie de nuevos descubrimientos que han hecho posible el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante.

### **Acido Ribonucléico (ARN)**

Aunque su existencia se conoce desde finales del siglo pasado, no es hasta 1953, después de los trabajos de Watson y Crick, cuando se descubre el importante papel que el ARN juega en la transmisión del mensaje genético en la síntesis de proteínas.

Esta síntesis tiene lugar en el citoplasma de la célula y la información necesaria para que tenga lugar, se encuentra en el ADN de los cromosomas del núcleo. Es necesario admitir la existencia de una molécula intermediaria que lleve la información del núcleo al citoplasma.

Fue a partir de 1953, cuando se admite de manera definitiva que el ADN sirve de molde para formar la cadena complementaria del ADN en el proceso de duplicación o replicación y también para la formación de la cadena complementaria de ARN en el proceso de transcripción.

Hay tres tipos principales de ARN: El ARN mensajero, el ARN ribosómico y el ARN transferidor: Los tres son fundamentales, a través de mecanismos complejos, para establecer y conseguir la secuencia de aminoácidos en la síntesis de proteínas.

La síntesis de numerosos ARN mensajeros, fue decisiva para el esclarecimiento de la "clave genética", la cual quedó completamente descifrada en el verano de 1966.

### **Retrotranscripción. Transcriptasa inversa**

En 1970, Temin y Baltimore, al descubrir la transcriptasa inversa, demuestran que el ARN puede servir de molde para la síntesis del ADN complementario.

La transcripción inversa es un proceso biológico por el cual la información genética transmitida y almacenada como ARN, se introduce como ADN en el genoma celular y permanece en el mismo como un provirus.

El fenómeno de la retrotranscripción se encuentra representado en el mundo biológico, fundamentalmente en los retrovirus, dentro de los cuales se encuentran el virus HIV causante del sida y numerosos virus oncogénicos.

La transcriptasa inversa, codificada por el gen Pol del genoma vírico, se localiza en las partículas infectivas del virus, de tal manera que puede actuar inmediatamente cuando el virus penetra en la célula adecuada. La cadena de ADN recién sintetizada sirve de molde para cambiar el genoma vírico en ADN, el cual se integra como provirus en el ADN del huésped, de tal manera que el ciclo vital se completa con la transcripción del ADN proviral a un ARN idéntico al infectivo.

Los retrovirus y por el fenómeno de la transcripción inversa, al poder ser utilizados como vectores en las modernas técnicas de **terapia génica**, están llamados a desempeñar un papel fundamental en el

tratamiento de numerosas enfermedades genéticas tanto heredadas como adquiridas.

Muchos de estos retrovirus contienen un gen que es homólogo de un gen de las células normales que controla la proliferación y diferenciación celular y cuya expresión alterada puede dar lugar a una transformación cancerosa. Razón por la cual en los últimos años esta adquiriendo gran interés la investigación del papel de los retrovirus en la génesis del cáncer. Se ha aislado estudiando detenidamente el ADN copiado del ARN del retrovirus y el ADN proviral; los interesantes resultados obtenidos llevaron pronto a admitir la oncogénesis por retrovirus, revolucionando el estudio del cáncer.

Por otra parte, la retrotranscripción, tiene además una nueva faceta por sus interesantes aportaciones en todo lo referente a la evolución de las formas más elementales de vida, desde hace millones de años, apoyando la hipotética teoría del paso de un mundo de ARN a otro de ADN.

Los grandes investigadores sobre el origen de la vida como Oparin, Crick y el español Juan Oro, creen que las formas más elementales de vida, fueron en sus comienzos mucho más simples que las formas más sencillas de nuestro tiempo. Admiten que podría tratarse de células o elementos formados únicamente por ARN, lípidos y proteínas y lo que es mucho más importante, que el ADN podría haber surgido de elementos procariotas. Consideren que la síntesis de proteínas puede tener lugar en ausencia de ADN, pero nunca en ausencia de ARN.

Si tenemos en cuenta la actividad enzimática o catalítica del ARN, recientemente descubierta, es lógico pensar que la síntesis proteica en estos elementos primitivos se basaba en el ARN. Posteriormente surgió el ADN que evolucionó hacia formas más complejas de vida, hasta llegar a nuestra especie.

Es muy posible que en este proceso evolutivo haya jugado un papel decisivo el fenómeno de la retrotranscripción.



## **Enzimas de restricción**

Otro de los grandes acontecimientos en el comienzo de la década de los años 70, es el conocimiento de los enzimas de restricción o tijeras enzimáticas, que han hecho posible el desarrollo de la manipulación genética a los altos niveles logrados. También son piezas fundamentales en el laboratorio de la tecnología del ADN recombinante.

El conocimiento de estos enzimas se inicia en 1953 con las primeras pruebas de la manipulación genética, al intentar implantar el ADN de una variedad de *E. Coli* en otra diferente y observar como el ADN implantado es rechazado, degradado y roto en fragmentos.

Pronto se vio que las bacterias disponen de mecanismos propios que les permiten distinguir su ADN del ADN extraño, mecanismos que radican en la modificación específica de su ADN por metilación de sus bases y en la existencia de los enzimas de restricción que reconocen al ADN no metilado como extraño, lo degradan y lo rompen.

Estos enzimas, por su propiedad de reconocer y romper el ADN extraño, representan los mecanismos de defensa de las bacterias frente a los numerosos "fagos" que las atacan; son el equivalente a nuestro sistema inmune.

Existen dos tipos de restrictasas, la primitiva o Tipo I, dada a conocer en 1968 por Linn y Arber y cuyos resultados no respondieron a lo que de ellas se esperaba, pues a pesar de reconocer a las bases no metiladas, no son específicas de ninguna secuencia de bases en el ADN, rompiendo su cadena de manera anárquica y haciendo imposible el estudio adecuado de los fragmentos obtenidos.

Dos años después, en 1970, Hamilton Smith, identifica nuevas restrictasas que rompen la cadena de ADN con arreglo a secuencias específicas de bases y características para cada enzima de restricción. Estas restrictasas Tipo II, cortan la doble cadena, producen varios tipos de fragmentos dependientes de la secuencia de bases específicas sobre las que actúan, y por lo tanto adecuados para estudios e investigaciones posteriores.

Desde entonces se han aislado e identificado numerosas restrictasas que proceden de más de 230 especies bacterianas diferentes, con más de 91 puntos de ataque a lo largo de la cadena del ADN, muchas de las cuales ya están disponibles en el mercado aunque a precios todavía relativamente altos.

Prueba de la importancia y trascendencia de los enzimas de restricción en la moderna genética molecular, es que cada año, en el primer número de la revista *Nucleic Acid Research*, se publica la lista actualizada de las restrictasas disponibles, juntamente con las secuencias que reconocen y su procedencia bacteriana.

Los diferentes fragmentos de ADN obtenidos por acción de las restrictasas son separados la mayor parte de las veces por electroforesis en gel de agarosa para posteriores manipulaciones dentro de la tecnología del ADN recombinante.

### **PCR. Reacción en cadena de la Polimerasa**

La tecnología del PCR es reciente, data de 1987 y ha representado un gran avance al simplificar algunos de los pasos de la tecnología del ADN recombinante y permitir de manera rápida y sencilla la amplificación de secuencias específicas del ADN, proporcionando cantidad suficiente de estos fragmentos para posteriores investigaciones y seguimientos.

La nueva tecnología se funda en la utilización de unos oligonucleótidos denominados **primers**, (cebadores) o iniciadores que no son ni más ni menos que secuencias cortas de nucleótidos obtenidos por síntesis que se hibridan específicamente con cada una de los dos cadenas complementarias de ADN.

La ampliación del fragmento se consigue realizando una serie de ciclos repetitivos, en cada uno de los cuales hay que considerar las siguientes etapas:

Desnaturalización por el calor del ADN molde calentando a 94° durante 20 segundos.

Hibridación de los primers con el ADN molde a 55° durante otros 20 segundos.

Síntesis del ADN complementario a 72° durante 30 segundos por acción de la ADN polimerasa. Si este ciclo se repite 30 veces, como fácilmente puede ser, se obtienen millones de copias del fragmento o secuencias del ADN limitado por los primers.

Como dato interesante, diré, que la tecnología del PCR tiene lugar en un volumen muy reducido, del orden de 50 a 100 microlitros y con una cantidad tan pequeña de ADN como la contenida en una sola célula, que viene a ser de unos 5 picogramos. Como norma general se obtiene de ADN una cantidad del orden de los 100 nanogramos, lo que representa unas 100.000 copias del ADN molde.

En un principio, se utilizó una ADN polimerasa procedente de la *E. Coli* (kleenow); tiene el gran inconveniente de perder actividad por encima de los 73°C, temperatura a la que se realiza la mayor parte del proceso de la síntesis de ADN, por otra parte, también hay que tener en cuenta que la exposición del enzima a temperaturas próximas a los 100°C necesarios para la desnaturalización del ADN, la inactivan por completo en cada ciclo de repetición. Pronto se observó que otra ADN polimerasa procedente de bacterias termófilas (*Thermus aquaticus*) denominada ADN polimerasa taq, permite la síntesis y la desnaturalización del ADN a temperaturas de 70° a 95°C sin pérdida de actividad.

Otra ventaja de la nueva tecnología es el permitir la ampliación de cualquier segmento de ADN, incluso en aquellos casos en que se encuentra deteriorado.

Tiene el inconveniente de la posible contaminación con material genético extraño, lo que tiene más importancia cuando la amplificación se realiza con escaso material genético, como puede ser, una célula, un espermatozoide o un pelo.

La marcha analítica a seguir con los fragmentos amplificados es la misma que se sigue en los distintos apartados de la tecnología del ADN recombinante: hibridación mediante dot blot, visualización directa en el gel poliacrilamida o de agarosa y secuenciación directa del ADN.

### **Regiones hipervariables**

Si consideramos los 6.000 millones de pares de bases contenidas en los 46 cromosomas del genoma de una célula humana y que la longitud de la cadena de ADN de una sola célula es de dos metros aproximadamente, la longitud del ADN de los 10 billones de células de nuestro organismo es lo suficientemente larga como para ir y volver de la Tierra a la Luna unas 8.000 veces aproximadamente.

Ante estas magnitudes, inmediatamente surgen preguntas fundamentales: ¿Como es posible identificar la localización exacta de un gen determinado de unos 10.000 pares de bases de longitud? ¿Como es posible secuenciar el genoma humano?

Por todo esto, fueron sumamente interesantes las aportaciones del Simposio de Cold Spring Harbor en 1977, donde se demostró que el ADN no es una secuencia continua de genes que codifican proteínas. Estos genes (exones) se encuentran separados por secuencias de bases que no codifican proteínas (intrones), en una proporción tal, que únicamente una parte, probablemente inferior al 10% del ADN, corresponde a los exones.

El problema todavía se aclara más, al saber que por lo menos el 50% del ADN, en su mayor parte, no codificador de proteínas, es altamente repetitivo y sin una función conocida.

Hay secuencias de 150 a 300 pares de bases que se repiten cientos de miles de veces en el genoma de la célula y debido a su gran variabilidad, constituyen una señal característica y específica para poder identificar a un individuo.

Fundándose en el reconocimiento de la hipervariabilidad de estas secuencias, en 1985, Alec Jeffrey, patenta un método de gran interés en Medicina Legal para la investigación de la paternidad con mucha mayor fiabilidad que las pruebas fundadas en los antígenos de histocompatibilidad e incluso que las mismas huellas dactilares.

Mediante el estudio de fragmentos de restricción de longitud variable (RFLO) y el seguimiento de posibles portadores de la misma familia se han conseguido interesantes resultados en el diagnóstico y conocimiento de determinadas enfermedades hereditarias como la fibrosis quística, poliquistosis renal del adulto, hemofilias A y B y distrofia muscular, entre otras muchas.

A título de curiosidad diré, que actualmente se está especulando en que algunas de estas secuencias repetitivas, sin función conocida, pueden proceder de secuencias antiguas comunes a roedores y primates, secuencias que se multiplicaron y esparcieron por el genoma como si se tratase de un virus.

## **EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS**

### **Enfermedades genéticas hereditarias**

En nuestro organismo, 25 millones de células se dividen cada segundo, proceso en el cual se duplican los 6.000 millones de pares de bases de cada una de ellas. Ante estos datos, es necesario admitir la asombrosa capacidad que tienen nuestras células, para reparar las alteraciones que continuamente se producen en su material genético, proceso maravilloso por su perfección e imprescindible para el mantenimiento de las especies.

Entre restrictasas, ligasas, ADN glicosilasas y ADN polimerasas, existen más de 50 enzimas diferentes que reconocen y reparan los errores que normalmente se producen, en los procesos de replicación y transcripción de su ADN. Este proceso de reconocimiento y reparación de

errores, es una operación muy similar a la que tiene lugar, en la corrección de pruebas en una imprenta una vez imprimido el texto.

Estas enzimas reconocen las bases alteradas, las separan, unen los dos extremos de la cadena, la ADN polimerasa añade de nuevo la base correcta. Para este proceso es imprescindible la cadena complementaria de ADN, que mantiene la información correcta y sirve de molde para la reparación.

Este proceso de reparación es tan complejo, que a pesar de su perfección, no ha de sorprendernos que pasen inadvertidos algunos de los errores cometidos, dando origen, como es lógico a una mutación, mutación que puede ser el punto de partida de una patología, de una enfermedad hereditaria.

De las numerosas enfermedades hereditarias, he seleccionado para este espacio, la hipercolesterolemia familiar y la mucoviscidosis, han sido precisamente estas dos, por su importancia, por su frecuencia, por representar un modelo a seguir en el estudio de otras enfermedades congénitas y por existir en ambas una relación clara y perfectamente conocida entre la alteración molecular y la enfermedad propiamente dicha.

### **Hipercolesterinemia familiar**

Es una enfermedad autosómica dominante, relativamente frecuente, las formas heterocigóticas afectan a una de cada 500 personas, por el contrario las formas homocigóticas son afortunadamente mucho menos frecuente, afectando a una de cada millón de personas.

Las formas heterocigóticas presentan niveles altos de colesterol en sangre, niveles que por lo general duplican las tasas normales, es frecuente la arterioesclerosis coronaria a partir de los 20 años, por lo que también son frecuentes las muertes por infarto a partir de los 30 y mucho más a partir de los 50 años.

En el 85% de los niños afectados, el diagnóstico puede establecerse correctamente con una simple determinación de colesterol en sangre, en el 15% restante, es necesario el diagnóstico genético. El tratamiento médico se limita a la dieta y fármacos adecuados, es importante el diagnóstico precoz para retrasar la aparición de los infartos.

Las formas homocigóticas son mucho más graves, cursan con niveles altísimos de colesterol plasmáticos, xantomas cutáneos desde los primeros meses de la vida y es muy frecuente la muerte por infarto de miocardio antes de los 20 años.

Fueron muy importantes para conocer las alteraciones moleculares de la hipercolesterolemia familiar, los interesantes trabajos de Brown y Goldstein, galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 1985.

Trabajando con fibroblastos de enfermos homocigóticos, vieron que la enfermedad radica en una serie de mutaciones en el gen que codifica la molécula de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), transportadoras del colesterol plasmático. Aislaron la proteína receptora de la corteza adrenal de vaca, secuenciaron sus aminoácidos y a través de la clave genética establecieron la secuencia de bases del gen que la codifica.

Encontraron la localización del gen en el brazo corto del cromosoma 19 y vieron que estaba formado por 18 exones y 17 intrones y que codifica una proteína de 860 aminoácidos.

Frecuentemente el diagnóstico genético directo es difícil por la heterogeneidad molecular de la enfermedad, por lo que muchas veces es necesario recurrir a estudios familiares.

La identificación y caracterización de las diferentes mutaciones responsables de la hipercolesterolemia familiar, ha permitido el desarrollo de sondas específicas, que hacen cada vez más posible el diagnóstico directo y la identificación de portadores.

Los enfermos homocigóticos, ante la falta de un tratamiento válido para su enfermedad son interesantes para ser sometidos a terapia génica. Esta se inicia en 1992 con tres pacientes. Y al parecer los

resultados son bastantes prometedores. El procedimiento de la terapia génica, en este tipo de enfermos, radica en el trasplante de hepatocitos autólogos que han sido modificados genéticamente con retrovirus recombinantes, portadores del gen rLDL, que codifica la molécula receptora. Con el tratamiento, descendieron considerablemente los niveles de colesterol plasmático y ha quedado abierta una puerta muy interesante en el tratamiento de estos enfermos.

### **Mucoviscidosis**

En términos generales, puede asegurarse que la localización del gen determinante de una enfermedad hereditaria, cuando se conoce la alteración metabólica o bioquímica de la misma, como es el caso de la hipercolesterolemia familiar, es mucho más fácil que en el caso de la mucoviscidosis en la que se desconocía tanto la naturaleza molecular del proceso, como la identidad de la proteína alterada. En estos casos la localización cromosómica del gen requiere una nueva tecnología como la "genética inversa o clonación posicional", descrita por vez primera en el año 1980 por Botstein y que implica el ver la distribución familiar de fragmentos de ADN, obtenidos por adecuadas enzimas de restricción, mediante técnicas de hibridación con sondas radioactivas elegidas al azar, pero específicas para diferentes localizaciones cromosómicas. Una vez localizado el gen y conocida la secuencia de sus bases, a través de la clave genética se conoció la estructura de la proteína por él codificada.

Hasta hace pocos años, muy poco se sabía de las bases moleculares de la mucoviscidosis, se había observado que los niños portadores de la enfermedad presentaban un sabor salado al besarlos, de esta manera se intuyó que podría tratarse de una alteración metabólica de la sal y nació el "test del sudor" (determinación de sodio en sudor) como prueba diagnóstica de la enfermedad, con muy buenos resultados.

La localización e identificación del gen causante de la enfermedad por Lop-Chee-Tsui en 1989, fue muy laboriosa por encontrarse si-



tuado en una zona compleja en el brazo largo del cromosoma 7. La secuenciación del gen permitió conocer la secuencia de aminoácidos de la proteína y posteriormente su síntesis. Resultó ser una proteína de membrana que regula los intercambios de cloro a través de las membranas y se la denominó Proteína C F T R (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulador).

Sólo unos pocos ml. de sangre son necesarios para obtener cantidad adecuada de ADN para construir el mapa RFLPs y sólomente unas gotas cuando se utiliza la técnica de PCR.

Con esta misma técnica se han podido localizar los genes causantes de otras patologías como la poliquistosis renal y la distrofia miotónica, pero aún no han sido secuenciados.

Hay enfermedades genéticas como la Xeroderma Pigmentosum y la Ataxia-Teleangiectasia que tienen su origen en alteraciones o mutaciones de los genes que codifican los enzimas reparadores y por lo tanto con problemas a la hora de corregir las lesiones o alteraciones del ADN, originadas la mayor parte de las veces en los procesos de replicación y transcripción.

Ambas enfermedades se caracterizan por una mayor sensibilidad a las radiaciones ionizantes y a la luz solar.

La Xeroderma Pigmentosum, se caracteriza además por la presencia de lesiones cutáneas; en una primera fase, la piel se vuelve dura y atrófica y posteriormente se retrae con reducción de los orificios nasales y de la boca y por una mayor tendencia al desarrollo de tumores malignos.

La Ataxia-Teleangiectasia, en su forma homocigótica, presenta una mayor tendencia a los tumores malignos, con una frecuencia de 60 a 180 veces superior a la de la población normal. La forma heterocigótica que afecta al 1% de la población normal, tiene una gran tendencia al desarrollo de cáncer de mama, páncreas, estómago, ovario y varios tipos de leucemias, sobre todo la linfocítica crónica.

Esta enfermedad puede ser la responsable del 9 al 18% de todos los tumores de mama.

## **Enfermedades genéticas adquiridas. Cáncer**

Independientemente de las enfermedades genéticas de origen hereditario, es importante considerar por su gran interés las enfermedades genéticas adquiridas, dentro de las cuales, destaca por su importancia el cáncer.

En términos generales puede afirmarse que el cáncer es una enfermedad genética, pero no hereditaria, sólo un número muy reducido de tumores parecen tener un componente hereditario fundamental, la mayoría tienen su origen en mutaciones acumuladas a lo largo de la vida en las células somáticas.

Es cierto que hay familias con mayor tendencia que otras a desarrollar determinados tipos de tumores, aunque este punto no está aclarado por completo, se intenta imputarlo a trastornos metabólicos que inducen a una mayor producción de sustancias cancerígenas endógenas, a una deficiente degradación metabólica de compuestos cancerígenos exógenos y también a un trastorno de los mecanismos de reparación del ADN.

También desempeñan un importante papel en el desarrollo de algunas formas de cáncer, otros factores que alteran el genoma celular, factores entre los que se encuentran el medio ambiente, el tabaco, determinados productos industriales como el cadmio y el amianto, las radiaciones ionizante y tipo de alimentación, circunstancias que explican las variaciones tanto en la naturaleza como en el número de cánceres de unas regiones a otras.

En los últimos años ha quedado demostrado, que el desarrollo tumoral tiene su origen en las alteraciones de aquellos genes que controlan y regulan el crecimiento, la división y la diferenciación celular. En el conocimiento y caracterización de estos genes y de sus mutaciones se centra desde hace algunos años la investigación de las bases moleculares implicados en el desarrollo tumoral.

Los factores carcinogénicos como el tabaco, radiaciones y otros más, se cree que actúan activando o desactivando lo que ha venido en llamarse oncogenes o antioncogenes.

En 1976, los norteamericanos J. Michael y Harold Varmus descubren el primer oncogén en un retrovirus. En un principio le creyeron con poder para transformar la célula normal en cancerosa, pero pronto vieron que se trataba de un gen de la célula normal en forma de protooncogén. Hoy se conocen más de 50 protooncogenes diferentes, todos ellos miembros de una misma familia que controla el crecimiento y la diferenciación celular, de los cuales sólo 12 están relacionados con el desarrollo tumoral en el hombre, siendo aún menor el número de genes supresores.

Uno de los problemas del proceso canceroso, es que normalmente es necesaria la activación de un oncogén o la inactivación de más de un gen supresor.

Dentro de este grupo reducido de oncogenes se encuentra la "familia ras", con tres formas diferentes: Hras, Kras y Nras, algunos de ellos perfectamente estudiados por el español Mariano Barbacid, que descubrió que la alteración que produce un gen activado es puntual, es decir, que únicamente esta alterada una base del nucleótido en el gen Hras, por lo que los genes mutados codifican proteínas en las que sólo un aminoácido de la cadena polipeptídica está alterado.

Estas mutaciones pueden ser identificadas o localizadas en el material genético obtenido del tejido tumoral, bien congelado o conservado en bloques de parafina.

El 90% de los carcinomas de páncreas, el 50% de los tumores de colon y el 30% de los carcinomas de pulmón presentan mutaciones en el gen Kras, mutaciones que no existen en los tejidos normales de los individuos portadores de estos tumores. En muchos casos estas mutaciones pueden encontrarse en pólipos y adenomas en los que aún no se han evidenciado lesiones malignas, pero sí consideradas como lesiones precursoras, lo que indica que la mutación en el gen Ras precede a la transformación malignizante.

En pacientes con poliposis adenomatosa familiar, proceso hereditario dominante y localizado en el cromosoma 5, la proporción de mutaciones de los genes Ras está presente en el 12% aproximadamente de los pacientes, es decir en proporción bastante inferior a la de los casos adquiridos de carcinoma de colon.

El 30% de los adenocarcinomas pulmonares, presentan también mutaciones en los genes Kras, habiéndose encontrado una correlación directa entre el número de mutaciones de los genes ras y el hábito tabáquico, lo que demuestra la presencia de factores mutágenos en el humo del tabaco.

Cerca del 30% de los enfermos con leucemia mieloide aguda, presentan la mayor parte de las veces, una mutación del gen Nras y también del gen Kras y con bastante menos frecuencia en el Hras. Estas mutaciones pueden persistir después del tratamiento con citostáticos a que por lo general son sometidos estos enfermos, dependiendo del estado celular en que la mutación se ha producido. La presencia de estas mutaciones agrava el pronóstico de la enfermedad.

De una manera general, se puede asegurar, que la casi totalidad de las células malignas presentan alteraciones cromosómicas, muchas veces específicas para cada tipo de tumor. Hoy se admite que muchas de estas alteraciones se relacionan con la activación de oncogenes responsables del crecimiento incontrolado de la célula.

Siguiendo con el estudio tumoral, nos apartamos por unos momentos de la tecnología del ADN recombinante para abordar el estudio tumoral bajo un nuevo punto de vista: **La citometría de flujo.**

### **Citometría de flujo**

En la década de los años 70, irrumpe en el laboratorio clínico una nueva tecnología de gran interés en el campo de la hematología, oncología e inmunología. Me estoy refiriendo a la citometría de flujo,

destinada a tener en adelante un papel cada vez más importante en el diagnóstico clínico.

La citometría de flujo nace de manera muy precaria en 1934, cuando Moldavan crea un sistema para el conteo celular, que consiste en hacer desfilarse a las células por un tubo capilar donde son captadas y contadas por un receptor fotoeléctrico. La técnica presenta serias dificultades por la frecuente obstrucción del tubo capilar, problemas que no se solucionan hasta 1953, cuando Rosland-Taylor siguiendo las observaciones de Reynolds, tiene la idea de inyectar lentamente las células en suspensión en el centro de una corriente líquida y rápida que las centra, las alinea y cuenta, disminuyendo los problemas de obstrucción.

En 1944, con la llegada de la tecnología Coulter, se da un paso importante hacia adelante, esta nueva tecnología mide los cambios de resistencia eléctrica que producen las células suspendidas en un líquido conductor al pasar a través de una pequeña abertura. El número de impulsos se corresponde con el número de células y la amplitud del impulso con el tamaño celular.

En 1965, Mahesbsky aporta nuevas mejoras al combinar la tecnología Coulter con técnicas colorimétricas de gran sensibilidad que permiten medir la pequeña cantidad de luz absorbida por un neutrófilo en la tinción de sus mieloperoxidasas citoplásmicas o la absorbida por una célula tumoral al teñir su ADN nuclear.

La citometría de flujo en su actual dimensión, se logra de manera definitiva en 1969, cuando Van Dila adopta el rayo láser como fuente luminosa de excitación.

La citometría de flujo permite el estudio rápido de grandes poblaciones celulares, bastante más allá de las posibilidades de los métodos citopatológicos tradicionales, a pesar de lo cual no ha podido desterrar a la citometría estática, que permite el diagnóstico con un número escaso de células, lo que no es posible con la citometría de flujo. Además, si a los datos que nos proporciona la citometría añadimos los morfológicos de la microscopía, potenciamos las posibilida-

des diagnósticas y pronósticas de ambas tecnologías: Friedlander y col., 1984; Kokal, 1986; Kunicka, 1987; Scot, 1987; Emdim, 1987; Corneliase y col., 1987; Coon y col., 1988 y Dresler, 1989.

La citometría de flujo al poder detectar los antígenos de superficie juega un papel importante en el inmunofenotipado de numerosas poblaciones celulares como linfocitos, monocitos, macrófagos, células mieloides y otras, ayudando por una parte al diagnóstico y seguimiento de leucemias y linfomas, de enfermedades inmunodeficientes, y de enfermedades autoinmunes; también colabora en el control del tratamiento quimioterápico de ciertas enfermedades hematológicas, en el control de la evolución de los trasplantes y en la determinación de antígenos de la serie HLA.

Otras posibilidades del sistema son hacer posible la cuantificación del ADN a nivel celular, agrupar a las células con arreglo a la fase del ciclo celular en que se encuentran, permitir la detección de antígenos tumorales, identificar un pequeño número de células neoplásicas entre un gran número de células normales.

Gracias a todo ello la citometría de flujo se ha convertido en una técnica de especial importancia en el campo de la oncología.

Se sabe desde hace tiempo, que las células cancerosas tienen un contenido anormal en ADN (aneuploidía), en contraste con las células somáticas normales cuyo contenido en ADN es diploide. La aneuploidía, pone de manifiesto la existencia de aberraciones estructurales o numéricas en los cromosomas de las células neoplásicas, anomalías detectadas más fácilmente con la citometría que con otras tecnologías.

La interpretación de la determinación de ADN es fácil, basta comparar el coeficiente de variación del pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (fase de reposo), de una población celular normal, generalmente linfocitos humanos, con el coeficiente de variación del mismo pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de la población tumoral, en el primer caso es igual o inferior a 2, siendo en la población tumoral bastante superior.

Una de las características más significativas y representativas de un tumor es su actividad proliferativa, existiendo una relación directa entre el contenido en ADN y el índice de división celular frente a la supervivencia del paciente. En el estudio histológico el número de mitosis es un índice aproximado de la actividad proliferativa, su medida es más exacta cuando se efectúa por citometría de flujo.

La determinación de ADN se funda en la tinción de las células con algunos de los muchos citocromos existentes actualmente, como yoduro de propidio, naranja de acridina, bromuro de etidio, etc. Estos compuestos fluorescentes se unen al ADN, de tal manera que la fluorescencia emitida tras la excitación con el rayo láser es proporcional al contenido en ADN nuclear.

El contenido en ADN en cada una de las células depende de la fase del ciclo celular en que se encuentran. Al permitir la citometría valorar el contenido de ADN de cada célula, indirectamente nos está dando el número de células en cada una de las fases del ciclo celular. Si consideramos que 100.000 células son estudiadas en unos pocos minutos, se comprende fácilmente las ventajas de esta nueva tecnología.

Normalmente el 95% de las células se encuentran en fase de reposo G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y son diploides (2N), por el contrario en la fase síntesis (S), el número de células es mucho menor y el contenido en ADN es mayor (2N-4N); las células en mitosis (G<sub>2</sub>/M) son las de mayor contenido en ADN (4N).

Un índice importante de la aplicación de la citometría de flujo en el área oncológica, es el **índice de ADN** que expresa el contenido en ADN o ploidía de una población celular. Se calcula dividiendo el contenido en ADN de una población celular normal diploide, con el contenido en ADN de la población celular objeto del estudio.

Por definición el índice de ADN de una población normal es 1. Las células malignas, por lo general, se desvían del contenido normal diploide, siendo hiperdiploides la mayor parte de las veces, las hipodiploidías son menos frecuentes. La presencia de aneuploidias en

el histograma siempre es signo de malignidad, habiendo una relación directa entre el grado de aneuploidía y la supervivencia del paciente.

Con alguna frecuencia, la presencia entre las células tumorales de células inflamatorias, endoteliales y otras, dan en el histograma un pico diploide.

En algunos tumores como leucemias o neuroblastomas los agentes quimioterápicos actúan selectivamente sobre poblaciones celulares aneuploides, teniendo una mayor supervivencia que cuando la población celular es diploide.

Desde 1988, tenemos en nuestro laboratorio un citómetro de flujo, independientemente de su empleo en plan asistencial en el campo de la inmunología, ha sido utilizado preferentemente en el área oncológica tanto en plan asistencial como en el área de la investigación.

Más concretamente, queremos destacar como este citómetro de flujo ha sido empleado para la realización de varias tesis doctorales versadas en diferentes aspectos de la patología tumoral así como en numerosos trabajos de investigación.

Una de ellas ha sido dedicada al estudio de tumores renales en los que se ha estudiado el contenido en ADN, tomando como patrón de referencia, el parénquima renal normal. Efectivamente se estudiaron 107 tumores renales sobre los cuales se determinó, utilizando el citómetro de flujo, la ploidía y la fracción proliferativa de cada uno de ellos. La cuantificación del ADN presentó la siguiente distribución: 53 tumores diploides, 4 triploides, 7 tetraploides, 22 hiperdiploides, 10 hipertriploides, 3 hipertetraploides y 8 con picos aneuploides.

El estudio de esta ploidía tumoral nos permitió, relacionándola con los estadios anatomoclinicos de Robson, observar como los tumores diploides se distribuyen irregularmente, con un 46% en el estadio I, un 52'94% en el estadio II, un 83'33% en un estadio metastático ganglionar y un 45'45% en aquellos que debutaron con metástasis a distancia, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas.



El estudio del índice proliferativo demostró que había una relación entre éste y el tamaño tumoral, presentando los tumores que ocupan todo el riñón, índices proliferativos superiores que los de localización cortical o medular, con diferencias significativas estadísticamente.

Con este estudio, se pudo determinar que la cuantificación del ADN ofrece información pronóstica adicional para pacientes en estadios I de Robson, mientras que el estudio de la fracción proliferativa tumoral es útil para pacientes con tumores aneuploides, tanto en los estadios localizados como en los metastáticos, así como de metástasis diploides, confirma que en la progresión tumoral intervienen otros factores que son independientes del contenido en ADN nuclear.

Otros trabajos se han orientado al estudio de 116 tumores astrogliales cerebrales, donde se determinó por medio del citómetro de flujo, la ploidía tumoral, la fase de síntesis y el índice proliferativo. Con el estudio de la ploidía tumoral se demostró que el patrón más frecuente fue el diploide, con un 59% de los casos, siguiéndole el tetraploide, con un 22% de casos. Aneuploides y casi diploides sumaron un 17.7% de casos. Por diagnósticos, los astrocitomas bien diferenciados fueron todos los diploides. Los astrocitomas anaplásicos mostraron un patrón más polimorfo, predominando el patrón tetraploide. Los glioblastomas multiformes fueron la mayoría diploides y con menor frecuencia aneuploidías. El tejido cerebral normal fue diploide en todos los casos. Relacionando la ploidía con la supervivencia, encontramos que los tumores diploides tienen una supervivencia media de 36+/-11 meses, similar a los tetraploides, con supervivencias de 41+/-8 meses y seguidos por los casi-diploides, que presentaron supervivencias de 35+/-16 meses. Los de menor supervivencia mostrada fueron los aneuploides.

Así pues, encontramos que la cuantificación del ADN en los tumores astrocitarios mostró un predominio de las formas diploides en los astrocitomas bien diferenciados, mientras que son los astrocitomas anaplásicos los que mayor número de formas aneuploides presentan.

Otro foco de interés ha sido el estudio de tres grupos de lesiones mamarias proliferativas (grupo de lesiones ductales, grupo de lesiones

lobulillares y grupo de patología varia de la glándula mamaria), en las que se determinó el contenido en ADN en 167 enfermas. Aquí, los resultados obtenidos con citometría de flujo, se compararon con los obtenidos por citometría estáticas.

En el grupo de lesiones ductales, la distribución de la cantidad de ADN fue la siguiente: Hiperplasia ductal sin atípías: el 93'3% de los casos fueron diploides y solo el 6'6% de los casos fueron aneuploides. Hiperplasia ductal con atípías: el 80% de los casos fueron diploides, el 20% aneuploides y un 10% tetraploides. Carcinoma intraductal: el 84'6% de los casos fueron diploides y el 15'38% aneuploides. Carcinomas infiltrantes: 35% de casos diploides, 45% de casos aneuploides y 20% de casos tetraploides.

Así mismo, los resultados obtenidos en el grupo de lesiones lobulillares fueron los siguientes: Hiperplasia lobulillar sin atípías: 83'3% de casos diploides, 10% de casos aneuploides y 6'6% de casos tetraploides. Hiperplasia lobulillar con atípías: 80% de casos diploides y 20% de casos aneuploides. Carcinoma lobulillar in situ: 62'5% de casos diploides y 37'5% de casos aneuploides. Carcinoma lobulillar infiltrante: solo se estudiaron 2 casos y fue uno diploide y el otro aneuploide.

Comparando los resultados obtenidos con esta técnica, con los obtenidos mediante citometría estática, observamos que en el grupo de lesiones ductales, el porcentaje de casos que mostraron la misma cantidad de ADN fue bastante alta (70% aproximadamente), si excluimos al grupo de carcinomas, en donde encontramos grandes diferencias de una técnica a otra. El estudio estadístico nos puso en evidencia que los resultados obtenidos por ambos grupos son homogéneos y solo encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grupo de carcinomas ductales infiltrantes. En el grupo de lesiones lobulillares, esta analogía fue menor (50% aproximadamente). En este grupo, el estudio estadístico sí que encontró diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos por citometría estática y los obtenidos por citometría de flujo.

Como resumen, podemos añadir que existe una buena correlación entre el índice de ADN obtenido por citometría estática y citometría de flujo en material incluido en parafina, siendo esta concordancia mayor en las lesiones displásicas que en los carcinomas. Ambas técnicas resultan complementarias entre sí. La citometría estática gana en especificidad al poder medir la lesión seleccionada previamente. La citometría de flujo gana en sensibilidad al detectar mayor número de núcleos y poder establecer la fracción proliferativa de la lesión.

En las lesiones ductales existe un progresivo aumento de alteraciones de la ploidía, desde la displasia ductal atípica al carcinoma intraductal frente a la displasia ductal sin atípicas. En las lesiones lobulillares, también hay un progresivo aumento de la aneuploidía desde la hiperplasia lobulillar sin atípicas, pasando por la hiperplasia lobulillar con atípicas hasta el carcinoma (in situ e invasor).

### **Tecnología del ADN recombinante. Presente y futuro**

El descubrimiento y aplicación de los enzimas de restricción, el conocimiento de los polimorfismos del ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el fenómeno de la retrotranscripción, son los pilares fundamentales en los que se apoya la tecnología del ADN recombinante, responsable del desarrollo alcanzado por la biología y la genética molecular en las dos últimas décadas del siglo.

Estos nuevos conocimientos, han permitido el aislamiento y caracterización de nuevos genes, de su estructura molecular, de su regulación, de su localización precisa en los cromosomas, pero sobre todo han hecho posible el relacionar sus alteraciones moleculares (mutaciones) con patologías concretas, facilitando a límites insospechados de perfección el diagnóstico y naturaleza de determinadas enfermedades genéticas, tanto hereditarias como adquiridas.

También han permitido la investigación de las bases moleculares de la oncogénesis, en los últimos años centrada en la identificación y localización de aquellos genes que controlan la división y diferenciación celular, cuyas anomalías son determinantes de las alteraciones del genoma celular, que tanta importancia tienen en el desarrollo tumoral.

Por otra parte, ciertos polimorfismos de los genes humanos, son indicadores de la importancia que tiene la base genética en la susceptibilidad a determinadas enfermedades más o menos comunes, como el paludismo, en parte vinculado al polimorfismo de la Hemoglobina S, a la beta talasemia y al déficit de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa.

También presentan un elevado grado de polimorfismo las moléculas codificadas por el "complejo mayor de histocompatibilidad", casi con seguridad, relacionado con la capacidad del sistema inmune para responder al elevado número de antígenos.

La posibilidad de detectar polimorfismos de ADN en muestras biológicas ha revolucionado la medicina legal y forense. El análisis de los RFLP permite la detección de huellas dactilares específicas del ADN de una persona. El empleo de la PCR ha mejorado en gran manera estas posibilidades, ya que la tecnología del ADN recombinante permite la detección de la variabilidad individual, pero la escasez de la muestra y la integridad de la misma suponían grandes limitaciones.

La gran hipervariabilidad del ADN mitocondrial presenta ventajas frente a la del ADN genómico. Según tejidos, existen por cada célula entre 100 y 10.000 copias de una secuencia determinada en el ADN mitocondrial, frente a una sola copia del ADN genómico, lo que tiene una gran ventaja cuando la muestra biológica es escasa.

También en el campo de la microbiología, las nuevas tecnologías, al permitir la rápida detección de virus, bacterias y hongos, presentan importantes ventajas frente a las técnicas clásicas.

La PCR, puede ampliar en pocas horas una secuencia determinada de ADN, con lo que los métodos de cultivo que requieren días y a veces semanas, están llamados a desaparecer.

Hay gérmenes patógenos cuyo cultivo es difícil, por lo que el diagnóstico no es posible o presenta serias dificultades.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la identificación de gérmenes no son específicos, necesitando en muchas ocasiones un buen número de anticuerpos para la identificación correcta.

Algunos métodos inmunológicos, únicamente son útiles varias semanas después del inicio de la infección.

Con relativa frecuencia, el sistema inmune está deprimido, tal es el caso de las inmunodeficiencias tanto adquiridas como congénitas, de ciertos procesos cancerosos, de ciertos pacientes con tratamiento antineoplásico, situaciones todas ellas en las que el diagnóstico inmunológico es difícil y comprometido.

Otras de las ventajas de la PCR, es el posible desarrollo de la técnica con escaso material biológico, como el obtenido en una biopsia, un lavado o una punción aspiratoria.

La nueva tecnología es muy útil en la identificación y cuantificación de algunos retrovirus humanos como los oncogénicos y los causantes del sida, tipo I y tipo II (VHI-1 y VHI-2). Los cultivos de estos virus procedentes de individuos seropositivos son laboriosos, largos y costosos. La PCR, ha resuelto el problema al permitir la detección de los mismos bastante antes de la aparición de anticuerpos. En el caso concreto del sida, la detección es posible a los 10 o 12 días de la contaminación, con las ventajas que esto representa, sobre todo en los análisis pretransfusionales, en el control de los recién nacidos y en los estudios epidemiológicos del sida.

En el caso de la hepatitis B, la PCR ha aumentado la sensibilidad unas 10.000 veces, permitiendo el diagnóstico de individuos seronegativos.

La hepatitis C, responsable del 15% de las hepatitis postransfusionales está presente en el 75% de los pacientes con carcinoma hepato celular lo que se interpreta como una posible influencia del virus en la patogenia de la enfermedad. La tecnología PCR ha resultado muy positiva.

La infección por citomegalovirus tiene importancia en los recién nacidos al originar retraso mental y sordera. En los individuos inmunodeficientes el virus es patógeno. En ambos casos el diagnóstico con la PCR es positivo.

En el caso de enfermedades víricas como sida, hepatitis, herpes, papilomas, etc., la determinación de la viremia por PCR, al reducir considerablemente el «periodo ventana», es más ventajosa que la determinación de anticuerpos, que por otra parte, frecuentemente siguen siendo positivos, después de curada la enfermedad.

Pero sobre todo, donde la tecnología del ADN recombinante ha resultado ser definitiva, ha sido en el desarrollo de la **«manipulación genética»**, punto de partida de dos realidades verdaderamente trascendentales: la **ingeniería genética** y la **terapia génica**, decisivas para el futuro de la medicina y de otros muchos campos como la agricultura y la ganadería. También contribuye al desarrollo del **Proyecto Genoma Humano**, de consecuencias imprevisibles para la Humanidad.

Es muy probable que los logros alcanzados, marquen la pauta de la medicina del próximo siglo, de manera similar a lo que sucedía hace 100 años exactamente.

El 28 de septiembre de 1895, moría en París el genial “intruso” de la Medicina D. Luis Pasteur. Sus aportaciones y las de sus colaboradores en el mundo de los seres infinitamente pequeños, tuvieron una influencia decisiva en lo que iba a ser la medicina de una buena parte de nuestro siglo.

La importancia y transcendencia que hoy pueden tener el aislamiento y secuenciación de genes determinantes de enfermedades concretas, como la fibrosis quística, la hemofilia B, la hipercolesterolemia familiar, son similares a las que en aquella época tuvieron el aislamiento y caracterización de los gérmenes causantes del cólera, del carbunco o de la tuberculosis.

El 6 de julio de 1885, nace la terapia antimicrobiana cuando el niño José Meister, mordido por un perro rabioso, además de salvar su

vida, se convierte en el primer ser humano sometido a una vacunación. Algo más de 100 años después, en 1990, el 24 de septiembre, una “niña burbuja”, de cuatro años, con un déficit congénito de adenosin desaminasa, salva también su vida y se convierte en el primer ser humano con el que se inicia la terapia génica.

Para finalizar considero inevitable una pregunta: ¿Qué sucederá dentro de 100 años?

No podemos hablar de futuro sin considerar las consecuencias que pueden derivar de un proyecto, en verdad trascendental, que puede estar terminado en un plazo aproximado de 10 años. Me estoy refiriendo al **Proyecto Genoma Humano**, que pretende y lo va a conseguir, la naturaleza y secuenciación de cada uno de los 100.000 genes que aproximadamente lo componen.

Para conocer el alcance y la grandeza del Proyecto Genoma Humano, basta saber, que la información que nos proporcionará sobre nuestro material genético, es de tal magnitud, que equivale a la información contenida en 200 guías telefónicas de 1.000 páginas cada una.

Toda esta información que gobierna y dirige toda nuestra vida, hasta en sus más mínimos detalles, ha sido heredada de nuestros padres y será transmitida a nuestros hijos, ha permanecido hasta ahora celosamente guardada en el interior del núcleo de cada una de nuestras células.

Con toda seguridad, las consecuencias que van a derivar del conocimiento de nuestro material genético, van a influir de manera significativa en algunas de las facetas de la vida humana, tanto a nivel de individuo como de colectividad. Hasta tal punto esto es cierto, que puede llegar a ser necesario reexaminar el concepto del propio ser humano y su posición dentro del contexto del resto de las especies que pueblan nuestro planeta.

Las aportaciones del Proyecto Genoma Humano pueden resultar de utilidad por los siguientes motivos:

Nos ayudarán a una mayor comprensión de la variabilidad y evolución del hombre a través de los tiempos.

Ponen a nuestro alcance medios de diagnóstico y tratamiento a través de la terapia génica, para prevenir y erradicar las cerca de 4.000 enfermedades genéticas que nos afectan.

En combinación con las técnicas inmunológicas, se crearán protocolos de gran eficacia para el diagnóstico precoz de muchas patologías y para el tratamiento del cáncer.

Ponen a nuestro alcance la posibilidad de predecir con mucha antelación a su aparición, alteraciones genéticas existentes y por tanto larvadas, lo que crea una nueva modalidad de laboratorio clínico: **los análisis predictivos**, beneficiosos por una parte y por otra desagradables, por las situaciones de angustia personal y familiar a que van a dar lugar.

Contrariamente, estos avances van a traer una serie de nuevos y graves problemas, de los cuales únicamente voy a referirme al principal de todos ellos, del que derivan prácticamente los demás.

El problema fundamental radica en el gran poder alcanzado por el hombre, al tener al alcance de sus manos, los medios necesarios para modificar su propio material genético, modificaciones que al poder ser transmitidas a generaciones siguientes, pueden tener consecuencias imprevisibles tanto a nivel individual como colectivo.

Del poder alcanzado por el hombre para cambiar su propia entidad, afortunadamente ha surgido el sentido de la responsabilidad. Por eso, toda una serie de especialistas: médicos, biólogos, genetistas, abogados, juristas, teólogos y sociólogos, colaboran conjuntamente en el Proyecto Genoma Humano, en un intento de lograr una legislación, unos principios bioéticos que amparen y preserven los derechos innatos a que tiene derecho todo ser humano, antes y después de su nacimiento.



En las reuniones de estos expertos, se ha sometido a debate y discusión los problemas que pueden derivar de la investigación y manipulación de nuestro material genético, con el fin de conseguir unas líneas de actuación para los próximos años, en un intento de hacer frente a cuestiones y situaciones que pudieran afectar a futuras generaciones.

Esta situación se produce, cuando nos hallamos en los umbrales de un nuevo siglo, de un nuevo milenio, ya bautizado como **el milenio de la modernización y la biotecnología**.

Ilmos. Sres. Académicos, Sras. y Sres: muchas gracias a todos Vds. por su amabilidad al compartir conmigo momentos tan emotivos para mi. Muchas gracias.

\*\*\*

## **Bibliografía**

- ASTBURY, W.T. X-ray studies of nucleic acids. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1: 66-67, (1947).
- AVERY, O.T., C.M. MacLEOD, and M. MacCARTY. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.*, 78: 137-158, (1944).
- BALTIMORE, D. Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature*, 226: 1211-1213, (1970).
- BENESCH, R. y BENESCH, R. The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin. *Adv. Protein Chem.*, 28: 211-237, (1974).
- BODANSKY, A.J. *Biol. Chem.*, 99: 197, (1932).
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. SKOLNICK, M. DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331, (1980).

- BROWN, MS, GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 223-261, (1983).
- BUNN, F., SEAL, U.S. y SCOTT, A.F. The role of 2-3 diphosphoglycerate in mediating hemoglobin function of mammalian red cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 241: 498-512, (1974).
- CHARGAFF, E. Estructure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.*, 10: 654-659 (1951).
- COOK, J.A., MARCONI, E.A. y DILUZIO, N.R. Lead, cadmiun, endotoxin interaction: Effect on Mortality and hepatic function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28: 292-302, (1974).
- COOK, J.A., HOFFMANN, E.O. y DILUZIO, N.R. Influence of lead and cadmiun on the suceptibility of rats to bacterial challenge. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150: 745-747, (1975).
- CORNELIESE, C.J. and VAN DRIEL-KULKER, A.M., DNA image cytometry on machine-selected breast cancer cells and a comparison between flow citometry and scanning cytophotometry. *Cytometry*, 6: 471-477, (1985).
- COULTER, W.H. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. Natl. Electronics Conf.*, 12: 1034-1042, (1965).
- DRESSIER, L.G. and BARTOW, S.E., DNA flow cytometry: practical aspects and clinical applications. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 6: 52-82 (1989).
- EDMIN, S.O., Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. *Cancer*, 60: 1282-1287, (1987).
- FRIEDLANDER, M.L., HEDLEY, D.W. and TAYLOR, I.W., Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J. Clin. Pathol.*, 37: 961-974, (1984).
- GRABAR, P. y WILLIAMS, C.A., *Biochim. Biophys Acta* (1955).
- GARROD, A.E., Inborn errors of metabolism. *Lancet*, 2: 1-7, 7379, 142-148, 214-220, (1908).

- GRIFFITH, F.: The significance of pneumococcal types. *J. Hyg. (Cambridge, UK)*, 27: 113-159, (1928).
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 897-930, (1977).
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., Lipoprotein receptors: Genetic defense against atherosclerosis. *Clin. Rev.* 100: 30-39, (1982).
- GOLDSTEIN, J.L., KITA, T., BROWN, M.S., Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis, lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *New Engl. J. Med.* 309: 288-296, (1983).
- JAMES, D. WATSON, JOHN TOOZE, DAVID T. KURTZ. *ADN Recombinante*. pag 1, Edt. Labor, S.A. Calabria, 235-239 (08029) Barcelona (1986).
- JEFFREYS, A.J. WILSON, V., THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" in human DNA. *Nature*, 314: 67-73, (1985).
- JEFFREYS, A.J. WILSON, V., NEUMAN, R. REYTE, J., amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction and towards DNA finger printing of single cells. *Nucleic Acids Res.*, 16: 10953-10971, (1988).
- KENNETH, C. CALDWELL and alter. Induction of Myeloperoxidase Deficiency in Granulocytes in Lead-Intoxicated Dogs. *Blood*, 53: 4 (April, 1979).
- KOKAL, W., DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *Jama*, 255: 3123-3127 (1986).
- RUNICKA, J.E., DNA in situ sensitivity to denaturation: A new parameter for flow cytometry of normal human colonic epithelium and colon carcinoma. *Cancer Res.*, 47: 3942-2947 (1987).
- LINN, S. and ARBER, W., Host specificity of ADN produced by *Escherichia coli*, X, In vitro restriction of hage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 59: 1300-1306, (1968).
- LURIA, S.E. and DELBRUCK, M., Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28: 491-511, (1943).

- MENDEL, G., Experimentos de hibridación de plantas, en J.R. Lacadena (coord.) *La genética ayer y hoy*. Madrid, Alhambra, (1984), pp. 1-48, y en E.W. Sinnott, L.C. Dunn y T. Dobzhansky, *Principios de Genética*, Barcelona, Omega, 1961, pp. 525-560.
- MENDEL, G., English translation of Mendel's experiments in plants hybridization, reprinted in: Peters, J.A., ed. *Classic Papers in Genetics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., (1959); and Stern, C., and E. R. Sherwood, eds. *The Origin Of Genitic*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, (1966).
- MOLDAVAN, A., Photoelectric technique for the counting of microscopical cells. *Science*, 80: 188-189 (1934).
- MORGAN, T.H., Sex-limited inheritance in *Drosophila* *Science*, 32: 120-122 (1910).
- MULLIS, K.B., FALOONA, F., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350, (1987).
- OCHOA, S. (1945). Isocitric dehydrogenase and carbon dioxide fixation. *J. Biol. Chem.*, 159: 243-244.
- OUSCHTERLONY, O., *Arkiv. Kemi*, 26B (1949), 1: Progr. allergy (1959 I).
- PAULING, L., and DELBRUCK, M., The nature of the intermolecular forces operative in biological processes. *Science*, 92: 77-79 (1940).
- PERUTZ, M.F., The Hemoglobin Molecule. *Scientific American* noviembre (1964).
- QUIRA y CADENAS, E., *Proteínas*. pág. 7-12, Prensa Científica S.A., Viladomat, 291-6<sup>º</sup>-1<sup>ª</sup>, 08029-Barcelona.
- RONA, P. y VAN EWEIR, C. *Biochem. Z.*, 149: 174, (1924).
- ROSLAND-TAYLOR, P.J.: A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*, 171: 37-38, (1953).
- SANGER, F. and TUPPY, H., The amino acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. *Biochem. J.*, 49: 463-490 (1951).

- SANGER, F. and THOMPSON, E.O.P., The amino acid sequence in the glycol chain of insulin. *Biochem. J.*, 53: 353-374 (1953).
- SCOTT, N.A., Flow cytometric DNA patterns from colorectal cancers. How reproducible are they? *Mayo Clin. Proc.*, 62: 331-337. (1987).
- SHAPIRO, H.M., *Practical Flow Cytometry*. Ed. Alan R. Lis, Inc. New York: pp. 10-21 (1988).
- SMITH, H.O., and WILCOX, R.W., A restriction enzyme from hemophilus influenzae, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.*, 51: 379-391 (1970).
- SOMOGYI, M.: 124: 179, (1938).
- STEVENS, N.M., Studies in spermatogenesis with especial referente to the accessory (sex) Chromosome. *Carn. Inst. Wash.*, publ. 36, 1-32 (1905).
- SWEDBERG, T., PEDERSEN, K.O., *The Ultracentrifuge* Oxford, Clarendon Press (Johnson Reprint Corp., New York), (1940).
- TEMIN, H.M., MIZUTANI, S., ARN-dependent ADN polymerase in virions of Rouse sarcoma virus. *Nature*, 226: 1211-1213, (1970).
- TSUI, L.C. et al. (1985) Cystic fibrosis defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*, 230: 1053-1057.
- TSUI, L.C. and BUCHWALD: (1991) Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. In: *Advanced in Human Genetics*, vol. 20, Harris, H. and Hirschhorn, K. (eds) Pleneum Press, New York, pp. 153-266.
- WARBURG, O. und CHREISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, 287-291 (1936).
- WATSON, E., Estructure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.*, 10: 654-659 (1951).
- YALLOW, R.S.. and BERSON, S.A., Assay of plasma insulin human subjetes by immunological methods. *Nature*, 184: 1948, (1959).

# **DISCURSO DE CONTESTACIÓN**

del Académico Numerario

**Ilmo Sr. Prof.**

**Dr. D. Juan Esplugues Requena**

Excelentísimo Sr. Presidente;  
Excelentísimos e Ilustrísimos Señores;  
Señoras y Señores:

REPRESENTA PARA MI una gran satisfacción ser el portavoz de la *Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana* en este solemne acto de recepción de Jesús Calderón. Influyen en ello diversos motivos, aunque quiero resaltar uno que para mi tiene un especial significado y hasta un cierto aire de melancolía, pues no en balde el mundo de los recuerdos guarda un parentesco indudable con el mundo de los sueños. Me refiero al reencuentro, en este instante, con aquellos ya lejanos años de la postguerra, en la que por avatares de la vida Calderón y yo coincidimos en una misma ciudad y sufrimos con toda crudeza las dificultades de aquellos tiempos. En aquel Valladolid de la postguerra española, cuando estábamos aun inmersos en las desgarradoras consecuencias del conflicto, permanecimos Calderón y yo en Colegios enraizados en aquella ciudad. Yo en la Providencia que acogía a los huérfanos de médicos. El en el de las Escuelas Cristianas. A lo mejor incluso llegamos a ser rivales en alguno de aquellos competidos partidos de fútbol que enfrentaban a los distintos colegios. Ambos, por tanto, pertenecemos a una generación especial, una generación que tuvo como compañeros inseparables la penuria, la inestabilidad y toda su cohorte de privaciones. Pero también fuimos la generación de la esperanza, que según barrunta **Carmen Laforet** en su entrañable novela "NADA", es aquella que padeció la guerra sin hacerla, la que no tuvo en la hecatombe ni arte ni parte. A nuestra generación se le había puesto un cartel de cierre donde el reclamo de "próxima apertura", no se leía ni en letra pequeña, y hacía falta mucho esfuerzo, paciencia e imaginación para demostrar que es posible encon-

trar un espacio más amplio y menos opresivo, si este se busca con fe, tesón e ilusión. Y esta fue la tarea que nos tocó afrontar en aquellos duros y fríos años. Y con ese bagaje adquirido en aquel ambiente, inició Calderón sus estudios de Farmacia. Y con la misma ilusión buscó el lugar más apropiado para realizar su trabajo profesional; y amplió su formación estudiando medicina; y permaneció en destacados laboratorios de su especialidad para realizar diferentes cursos de análisis bromatológicos, radioisótopos, citología hematológica, intoxicaciones profesionales, etc.; y creó un laboratorio de análisis considerado ejemplar; y se vinculó a numerosas sociedades científicas; y publicó sus resultados en prestigiosas revistas científicas; y participó en congresos nacionales e internacionales; y ganó las oposiciones al cuerpo de inspectores farmacéuticos; y colaboró y colabora con diversas entidades profesionales entre las que destacan la Mutua de Azulejos de Onda, el I.V.O., el Departamento de Anatomía Patológica, la Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, etc. La dirección del libro **Saturnismo profesional, estado actual**, y su Doctorado en Farmacia, así como las Tesis Doctorales realizadas en su Laboratorio, son la mejor tarjeta de presentación para mostrarnos a un científico ilusionado y profundo, es decir a un científico sin fronteras.

Pero hay otra cualidad a resaltar en estos tiempos por su infrecuencia: la generosidad. Como habéis oído, Calderón no escatima elogios para quienes fueron sus maestros ni para quienes en algún momento contribuyeron a su formación o con quienes colaboró. Calderón es así; además de generoso y agradecido, es desprendido, amable, condescendiente.

En lo personal nunca ha renunciado a sus raíces castellanas, aunque buscó y encontró una nueva patria en esta tierra nuestra, porque Calderón es valenciano por decisión propia, quizá porque la imagen del mar haya sido para el sinónimo de libertad y de aventura. Calderón es castellano en el decir; llano y desnudo, pero es emprendedor, luchador, creativo como nuestro pueblo. Y además sensible y fraterno.

Analiza Calderón en su discurso de ingreso, un tema tan sugestivo como el de las **proteínas y los ácidos nucleicos**, a las que como muy bien



dice en la introducción considera las dos moléculas mas importantes de la vida pues rememorando las opiniones de **Guira y Cadenas**, *los ácidos nucléicos son las moléculas que programan lo que los seres vivos son y lo que pueden hacer, pero la puesta en escena corresponde a las proteínas, de las cuales depende el éxito del organismo en el mundo altamente competitivo en el que nos ha tocado vivir.*

Hace Calderón un meticuloso recorrido por el desarrollo de los conocimientos sobre las proteínas desde 1905, año en el que gracias a los trabajos del alemán Ficher, se sabe son macromoléculas formadas por largas cadenas de alfa-l-aminoácidos que se unen por enlaces peptídicos para formar un polipéptido. Como consecuencia de los numerosos plegamientos de la cadena, las proteínas adquieren una configuración tridimensional en el espacio, de la cual van a depender muchas de sus propiedades, incluidas las biológicas.

Se extiende Calderón en un minucioso análisis de la evolución que ha seguido la cuantificación de las proteínas en la práctica del laboratorio clínico, y hace un estudio detallado de los avances técnicos conseguidos desde los comienzos de la década de los 50 con los primeros fotocolorímetros, hasta el momento actual. Los métodos fisicoquímicos como la ultracentrifugación y la electroforesis merecen un comentario especial, pero presta una mayor atención a las técnicas inmunológicas y la enzimología clínica.

Dedica Calderón un espacio amplio a la **hemoglobina**. La selección del estudio de esta molécula la justifica *“por los interesantes y perfectos mecanismos moleculares que regulan su función”*. Pero es que además, la determinación de algunos enzimas implicados en la biosíntesis del “grupo hemo” como el ALAdeshidrasa, y la identificación de los principales metabolitos intermediarios de dicha vía metabólica, resultan fundamentales en el diagnóstico y seguimiento del saturnismo, un cuadro en el que podemos considerar a Calderón como un destacado experto, como demuestra su Tesis Doctoral, dedicada a este interesante problema. También se ocupa Calderón en su discurso del sugestivo capítulo de la citometría de flujo, de tan importante interés en el diagnóstico clínico.

En la segunda parte de este discurso de ingreso, aborda Calderón el apasionante campo de **los ácidos nucleicos**, mostrando un sugestivo panorama de la evolución de este capítulo, al que denomina con el atractivo título "*de Mendel a la tecnología del ADN recombinante*". El estudio de la transmisión hereditaria de caracteres bien definidos efectuado por el fraile agustino Mendel, fue el sobrecogedor punto de partida capaz de revolucionar el mundo científico actual.

Se extiende Calderón en las diferentes etapas que nos han llevado a profundizar en los complicados procesos de la herencia, que pasa por identificar los cromosomas y describir su decisivo papel en la herencia. Poco después, estamos en 1909, aparece el término gen, su localización en los cromosomas y la identificación como las verdaderas unidades hereditarias. Poco a poco, se va ensanchando este apasionante campo, hasta establecerse en 1956 que el genoma humano está formado por 23 pares de cromosomas. Desde este momento asistimos a una auténtica explosión de descubrimientos que nos permiten asegurar que estamos en los umbrales de una nueva revolución científica, cuyo inicio se sitúa en la mitad de la década de los 80. En el proyecto genoma humano se depositan las mayores esperanzas para el futuro de la humanidad, porque gracias a los avances de la biotecnología ya es posible manipular microorganismos o mejorar la biosíntesis de las plantas o combatir con eficacia determinadas plagas. El genoma de cada individuo puede considerarse como una biblioteca donde está escrita toda la información para la construcción y funcionamiento de ese individuo. En el genoma humano la biblioteca abarcaría 3.000 libros de 1.000 páginas cada uno. Cada página, a su vez, equivale a un gen.

Pero aun hay más, la biotecnología es una ventana abierta a la esperanza de conseguir un futuro mejor para la salud y la humanidad. Gracias a la ingeniería genética, ya se obtienen productos terapéuticos de enorme valor. Por ejemplo, en el momento actual, existen en España al menos quince productos terapéuticos mediante manipulación genética (nos bastará recordar insulina humana, interferón 2A y 2B, hormona del crecimiento, eritropoyetina, vacuna anti-hepatitis B, entre otros), y los

investigadores siguen estudiando la forma de conseguir animales preparados genéticamente para producir nuevas armas terapéuticas.

Pero en donde se depositan las mayores ilusiones del proyecto genoma humano, es en la búsqueda de solución para las cerca de 4.000 enfermedades genéticas conocidas, incluyendo diferentes variedades del cáncer. Para llegar a esta situación, se ha hecho necesario coordinar el trabajo de centenares de investigadores. Las aportaciones escalonadas nos han permitido esclarecer la estructura del ADN como la molécula fundamental de la vida porque lleva en su configuración la información hereditaria que determina la estructura de las proteínas. Contiene las instrucciones que gobiernan el crecimiento y la división celular y la diferenciación del huevo fertilizado..., y resume **Watson**: *“el ADN ha sido la base del proceso evolutivo que ha generado los millones de formas distintas de vida que han ocupado la Tierra desde la aparición de las primeras estructuras con vida hace tres o cuatro mil millones de años”*.

En el documentado estudio de Calderón, se han abordado con seriedad y rigor aspectos tan interesantes como el ácido ribonucleico (ARN), la retrotranscripción, los enzimas de restricción, la reacción en cadena de la polimerasa, las regiones hipervariables. Pero donde adquiere su trabajo una especial relevancia es cuando analiza la aplicación práctica de todos estos conocimientos en el diagnóstico de las enfermedades congénitas como hipercolesterinemia familiar, mucoviscidosis, etc., y algunas enfermedades genéticas adquiridas como por ejemplo distintas formas de cáncer.

Quizá uno de los mayores logros de la bioquímica moderna ha sido diseñar modelos experimentales para transferir el ADN de una especie a otra. Este proceso se conoce como ADN recombinante o clonación de genes. Consiste en insertar el ADN que forma el gen de un animal superior en el ADN de una bacteria o levadura. Como todas las especies utilizan el mismo código para convertir el ADN en proteínas, este proceso permite reproducir la proteína del animal superior en una célula microbiana. Otro camino fascinante es la mutogénesis dirigida, es decir, modificar la estructura primaria de una proteína cambiando simplemente la secuencia del ADN correspondiente. Aun cuando el ADN recombinante sólo sirvie-

ra para mejorar nuestros conocimientos del funcionamiento de los sistemas biológicos, sería ya un gran avance. Pero hay mucho más, porque esperamos conseguir la clave de patologías tan complejas como el cáncer, reumatismo, arterioesclerosis, demencia senil, etc.

La clonación de un gen requiere un gran esfuerzo, pero el éxito está garantizado. Esta nueva tecnología abrirá impensables caminos a la terapéutica, aunque no exentos de riesgos y controversia, pues nos dan acceso a poder alterar el genoma humano, con toda la problemática que ello conlleva. Si tras lanzar la primera bomba sobre Hiroshima, hubo quien dijo que los científicos habían comido la fruta prohibida del árbol del conocimiento, ahora también se levantan voces críticas sobre los cambios que se vislumbran con la posibilidad de modificar el genoma humano. Los cambios operados en este sentido, son considerables, y si algunos pueden obedecer al capricho o a la moda y, en tal sentido, van y vuelven, otros, por ser fruto de una reflexión profunda, acaban adquiriendo carácter de naturaleza. Este es el reto de nuestro tiempo. La ingeniería genética está modificando nuestras relaciones y nuestra percepción de la naturaleza del mundo. Pero el ser humano deberá afrontar una situación delicada: tratar de controlar unas fuerzas que él mismo ha desatado y que ahora le hacen frente amenazando su integridad. Este es el dilema del futuro: dónde comienza y dónde termina la libertad de investigación.

Como habéis visto, Calderón es una cabeza que piensa y ayuda a pensar, una mente enriquecida día a día con lecturas y experiencias, por largas pausas de reflexión. Tiene una manera práctica y disciplinada de afrontar su trabajo. He aquí la prueba de fuego para el científico. En resumen ha conseguido aunar y hermanar el recio y sobrio carácter castellano, con la voluptuosidad e imaginación del valenciano, y el resultado ya lo veis, un trabajo serio y actual.

He dicho.