

LA IDENTIDAD MOLECULAR DE LOS VERTEBRADOS

UN ESTUDIO INMUNOQUÍMICO DE LAS AMINOTRANSFERASAS L-ASPARTICO 2: OXOGLUTARICO (TRANSAMINASA) DE CORAZÓN E HIGADO DE MAMÍFEROS*

DR. FÉLIX CÓRDOBA

HASTA épocas relativamente recientes se pensaba que las proteínas propias de los animales y las proteínas con función idéntica de diferentes órganos de los mismos, eran macromoléculas bastante diversas de tal manera que se pudiese hablar de albúmina sérica humana como distinta de la albúmina sérica de conejo o de caballo, o de la hemoglobina de mono, como una molécula químicamente diferenciada de la hemoglobina del hombre. Se suponía que cada una de estas familias de proteínas pudiera ser particular de cada especie y que la diferencia persistiría aun cuando las proteínas consideradas como grupos hubiesen de cumplir funciones similares en cada uno de sus representantes biológicos. Por otra parte, y consonante con lo anterior, existía la idea de que los diferentes órganos especializados del vertebrado, además de estar constituidos con proteínas de la circulación y otras estructurales, como la colágena, deberían contener en adición, otras proteínas, que definieran, desde el punto de vista bioquímico o inmunológico, el tejido muscular, el tejido hepático, el tejido cardíaco, etc., a pesar de que cada célula de estos órganos cumple, aparte de las funciones especializadas, una multitud de cambios metabólicos comunes a todas las células de los organismos vivos.

Esta hipotética distribución de proteínas en el reino animal presentaba, ya casi desde su concepción, aspectos oscuros y contradictorios ya que hacía necesario postular una complejidad somática y por consecuencia, genética, innecesaria por lo extenso, que aparecía en franca contradicción con las conocidas tendencias sintéticas y simplificantes que se observan en una evolución bien es-

* Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina, presentado por su autor en la sesión del 7 de octubre de 1964.

tablecida de las especies. Parecía superfluo que para una sola reacción química se hubiesen diseñado miles de proteínas diferentes, y lo que parecería menos claro, que continuasen funcionando todas ellas en forma simultánea.

Por otra parte, era sabido que dentro de las proteínas de los vertebrados, las más accesibles a estudios, como las del suero, al ser analizadas de modo comparativo, como por ejemplo con los métodos de la serología, daban relaciones moleculares según los lineamientos de un árbol evolutivo confirmando los hallazgos hechos por otras técnicas de comparación biológica.

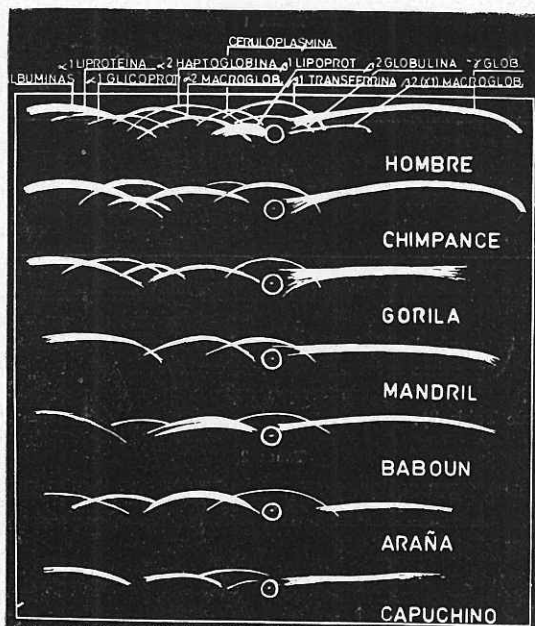
Los trabajos de Boyden¹ son amplios en este sentido y los más recientes de Williams,² con técnicas más modernas, confirman la idea de una evolución molecular consonante con la morfología.

En la actualidad el consenso de opiniones, en relación al problema mencionado, es de que las mutaciones ejercidas sobre la maquinaria biosintética de las proteínas, en el transcurso de millones de años de evolución biológica, han determinado la aparición de algunos grupos propios de las especies actuales, no necesariamente una molécula diferente para cada especie, sino grandes grupos que abarcan poblaciones animales que, desde el punto de vista morfológico, pueden estar evolutivamente muy separados.

Existe, es cierto, una gradación protéica definitiva que salta pausadamente de especie a especie (como se muestra en la figura del trabajo de Williams) que permite identificar el animal o el grupo al cual pertenece por una diferencia molecular de cierta magnitud útil. Siendo esto evidente, también lo es el que un organismo vivo no esté formado exclusivamente de proteínas de este tipo, evolucionadas de acuerdo con la especie. Los resultados claros, que se miran en los experimentos comparativos con sueros de primates en la misma figura, no serían tan claros si se tratase de comparaciones de hemoglobinas. Según Pauling³ y otros,⁴ las hemoglobinas de ciertos monos superiores son más parecidas molecularmente a las hemoglobinas humanas normales que a otras hemoglobinas de humanos afectados con ciertas anemias.

En el presente trabajo nos referiremos a este segundo tipo de proteínas como representantes con una base bioquímica, posiblemente más permanente ya que su tendencia a cambiar por mutación o alteración somática es mucho menor o menos aparente que la de las otras proteínas consideradas. Es más, y como se podrá apreciar por nuestros resultados y los de otros autores, en un momento dado se hace necesario, por razones que aún desconocemos que se sintetice no una, sino dos proteínas para llevar a cabo la misma función celular dentro de un tejido especializado. Este último tipo de proteínas tisulares está mejor representado por las enzimas, destacando entre ellas las isoenzimas de transaminación estudiadas por nosotros. Las deshidrogenasas lácticas, muy estudiadas por su polimorfismo molecular, representan otro caso interesante de proteínas, sin embargo, presentan aspectos diferenciales donde la evolución orgánica se hace evi-

dente y por lo tanto no las consideraremos por ahora. Otras proteínas, como las estructurales de membranas y de partículas intracelulares son representantes de base biológica en cada tejido pero, por razones de constitución propia e insolubilidad, están todavía pobremente estudiadas y cualquier mención de ellas con fines comparativos tiene que ser especulativa.



Patrones inmunoeléctroforéticos de sueros de primates desarrollados con anticuerpos de suero de caballo contra suero humano. Williams, Ca. Ann N.Y. Ac. Sc. (1961).

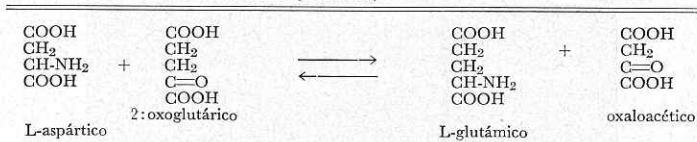
Presentaremos algunos datos experimentales de comparaciones enzimáticas tratando de esclarecer el parentesco inmunoquímico y funcional entre las proteínas de diferentes órganos de un animal y tener base para decidir si las enzimas pueden clasificarse en forma gradual de acuerdo a eslabonamientos evolutivos.

Aunque en los últimos años hemos empezado a trabajar enzimas diferentes a las transaminasas, la mayoría de nuestros resultados experimentales se obtuvieron

mediendo una sola actividad enzimática; la debida a las enzimas que catalizan la conversión del ácido L-aspartico a ácido 2-oxoglutarico por la movilización del grupo aminado del primer ácido, a la molécula del segundo. Los productos de esta reacción son el ácido oxaloacético, remanente de la desaminación del L-aspartico, y el ácido L-glutámico, aparecido al aminarse el 2-oxoglutarico. (Véase tabla 1).

TABLA 1

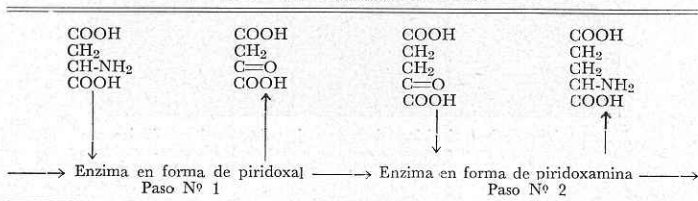
REACCION DE TRANSAMINACION PRODUCIDA POR LAS ENZIMAS (TRANSAMINASAS) UTILIZADAS COMO ANTIGENOS EN ESTE ESTUDIO
(La medición de la actividad enzimática se obtiene por el análisis espectrofotométrico de la cantidad de ácido oxaloacético producida).



Como es bien sabido, esta transaminación al igual que otras, requiere como coenzima al fosfato-5' de piridoxal, derivado vitamínico, que actúa en el sitio de la reacción y según las hipótesis más valederas acarrea directamente el radical aminado, al convertirse a fosfato-5' de piridoxamina, de un aminoácido a un cetoácido y viceversa, actuando siempre unido a la proteína de la propia enzima. (Véase Tabla 2).

TABLA 2

MECANISMO "PING PONG" PROPUESTO POR HENSON Y CLELAND (1964)
PARA LA TRANSAMINACION



Los resultados de nuestro trabajo pueden ser presentados desde dos puntos de vista independientes. Hemos comparado las enzimas con anticuerpos de conejo (contra las transaminasas de corazón e hígado de cerdo) y los mismos anticuerpos contra otras enzimas derivadas de tejidos similares, de hombre y de rata, para tratar de encontrar relaciones serológicas definidas entre cada representante

enzimático. En otra parte del trabajo, hemos preparados algunas de estas transaminasas, como la de corazón y la de hígado de cerdo, en estado homogéneo de modo que al reaccionar con anticuerpos de conejos dan ahora reacciones con una sola banda de precipitación en las placas de difusión de gel de agar. (Estos resultados, como es sabido, indican la presencia de un solo antígeno en estas pruebas serológicas). Por último, en experiencias más recientes, hemos estudiado el efecto de la adición de los mismos sueros antitransaminasa en el comportamiento "in vitro" de las enzimas de puerco en distintas concentraciones de sustratos y de anticuerpos para distinguirlos en su efecto catalítico.

TABLA 3

REACCIONES DE PRECIPITACION EN PLACAS DE AGAR ENTRE LAS TRANSAMINASAS TCH: DE CORAZON HUMANO, THH: DE HIGADO HUMANO, TCC: DE CORAZON DE CERDO, THC: DE HIGADO DE CERDO, THR: DE HIGADO DE RATA Y ANTISUEROS DE CONEJO CONTRA VARIAS DE ELLAS

—cada (+) corresponde a una banda de precipitación.

Suero usado	TRANSAMINASAS DE TEJIDOS DE MAMIFEROS				
	TCH	THH	TCC	THC	THR
Anti-TCH	+	++	—	—	++
Anti-THH	++	+	+	—	+
Anti-TCC	—	—	++	+	—
Anti-THC	—	—	++	+	—

Córdoba y col., (datos no publicados).

En la Tabla 3, se aprecian las reacciones de precipitación con los diversos antígenos mencionados que en algunos casos, como en los de suero anticerdo con proteínas de origen humano, nos hacen pensar en una relación o parentesco y por lo tanto molecular, entre las transaminasas en tejidos de diversas especies de mamíferos. Este parentesco serológico entre enzimas no solamente se puede poner de manifiesto experimentalmente con este procedimiento, sino que tanto Morino y col.,⁸ como nosotros mismos,⁹ hemos utilizado la propiedad que presentan los

TABLA 4

PORCENTAJES DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LAS TRANSAMINASAS POR SUERO DE CONEJO ANTI-TRANSAMINASA DE CORAZON HUMANO

Anti-TCH mg.	TRANSAMINASA DE				
	Corazón humano	Hígado humano	Corazón cerdo	Hígado cerdo	Hígado rata
0.78	8	12	0	2	7
7.80	60	56	46	30	39
23.40	100	100	98	89	90

Tomado de: Córdoba y col., (1963).

anticuerpos para inhibir la reacción enzimática "in vitro", como otra arma serológica en estos estudios comparativos. (Véase Tabla 4).

En contraposición de lo que decíamos al principio de esta exposición sobre la tendencia unificante y económica que se presenta en la naturaleza cuando se examinan comparativamente las proteínas, desde los trabajos de Fleisher¹⁰ se sabe que la actividad enzimática transaminante en este tipo de tejidos se debe a la suma de las acciones de dos llamadas isoenzimas de transaminación, una de ellas, estudiada por nosotros con detalle, la soluble del citoplasma y la otra, que comprende 30% de la actividad total, que se encuentra localizada dentro de las mitocondrias. Los datos que existen hasta ahora en la literatura especializada, como los mencionados de los autores japoneses⁸ indican que son dos proteínas, con la misma función biológica, localizadas específicamente en dos lugares muy definidos de la célula y lo que es más, que se comportan en las pruebas serológicas, como dos antígenos totalmente diferentes (Véase Tabla 5).

TABLA 5

PORCENTAJES DE INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LAS TRANSAMINASAS POR SUERO DE CONEJO ANTI-TRANSAMINASAS DE HIGADO DE BUEY. SUERO S: CONTRA TRANSAMINASA HEPATICA SOLUBLE (FUERA DE MITOCONDRIAS) Y SUERO M: CONTRA TRANSAMINASA HEPATICA DE MITOCONDRIAS

	T R A N S A M I N A S A D E							
	Hígado buey	Corazón buey	Hígado cerdo	Corazón cerdo	Hígado rata	Riñón rata	Cerebro rata	Músculo rata
Anti-Hígado de Buey S	80	80	78	80	60	55	63	50
Anti-Hígado de Buey M	80	80	80	77	40	40	50	65

Adaptado de Morino et al., (1964).

La síntesis intracelular de estas dos proteínas debe estar regulada factiblemente por genes diferentes, que por los mecanismos conocidos de síntesis de proteínas, fabricarán dos transaminasas para cada célula. Es interesante hacer notar que en el momento actual se cree que la síntesis de proteínas está limitada al citoplasma celular debiendo suponerse entonces que la mitocondria puede ser otro asiento para la fabricación de proteínas o que alternativamente, debe existir un mecanismo de movilización de enzimas del citoplasma hacia este organelo.

Los resultados complementarios en la comparación de estas dos isoenzimas entre tejidos de distintos animales sugieren que cada una de ellas, tan diferentes entre sí, son muy parecidas a las respectivas de otros órganos del mismo animal, a pesar de la variación morfológica y fisiológica de cada órgano, como se demuestra cuando cada una de ellas es comparada en los tejidos de otros vertebrados. (Véase Tabla 5).

Para reafirmar el argumento de identidad molecular protéica en diversos órganos de un solo animal, podemos presentar datos adicionales obtenidos con las transaminasas de corazón e hígado de cerdo. Estas otras experiencias comprendieron una exploración del comportamiento de estas enzimas,—que podrían ser llamadas “panenzimas” por estar localizadas en muy distintos tejidos—, con el fin de destacar si su comportamiento catalítico “in vitro” es similar.

En la Tabla 6 se presentan valores de constantes de Michaelis obtenidos con las enzimas purificadas de tejidos porcinos. Estas mediciones se hicieron con la enzima libre en solución y en presencia de soluciones diluídas de anticuerpos de conejo. Los resultados parecen indicar que estas enzimas son muy parecidas.

En relación con este problema, debemos mencionar que las soluciones de anticuerpo no se comportan igual en todas las condiciones de concentración. Se pueden diseñar experimentos para demostrar que las concentraciones altas de este reactivo pueden alterar sensiblemente la acción de las transaminasas. Al efectuar experimentos de esta manera existen francas alteraciones en los valores de las constantes de Michaelis, como se lee en la última línea de la Tabla 6, con las de hígado.

TABLA 6

CONSTANTES DE MICHAELIS DE LAS TRANSAMINASAS
DE CORAZON E HIGADO DE CERDO
(Los valores están en concentraciones M)

ENZIMA	Acido L-aspartico	Acido 2: oxoglutarico	ENZIMA
THC (testigo)	16×10^{-3}	1.5×10^{-3}	TCC (testigo)
	16×10^{-3}	1.6×10^{-3}	
THC (con antisuero 1:25)	16×10^{-3}	1.6×10^{-3}	TCC (con antisuero 1:25)
	15.6×10^{-3}	1.5×10^{-3}	
THC (con antisuero 1:8)	5.8×10^{-3}	0.5×10^{-3}	

Tomado de: Córdoba y González (1964) (en preparación)

Si recordamos los múltiples efectos “in vitro” e “in vivo” que se atribuyen a las inmunoglobulinas, este mecanismo de acción de la anti enzima no parece nuevo; la hemólisis, la citólisis, la bacteriólisis y otros efectos “in vivo” que manifiestan los anticuerpos y que han sido bien analizados requieren, sin embargo, la mayoría de las veces de la participación del complemento. Los efectos observados ahora, con enzimas purificadas, indican que la interacción proteíno-pro-

teína, al menos las de este tipo, conducen a alteraciones especiales de la molécula del antígeno en solución. También este tipo de alteraciones ha sido postulado con anterioridad, en sistemas antígeno-anticuerpo. Ishizaka K. e Ishizaka T.,¹¹ indican que estas alteraciones, descritas, exclusivamente en las moléculas de gamma-globulinas, y muchos de los efectos biológicos del anticuerpo son explicados, como debidos a la distorsión molecular de las gamma-globulinas en los precipitados específicos o en los complejos solubles. No hay en la literatura especializada, hasta donde sabemos, experiencias informando alteraciones de conformación para *antígenos protéicos*. En la mayoría de los casos se infiere que la precipitación de un antígeno por el anticuerpo es inocua para el antígeno; es decir, que no modifica permanentemente la estructura terciaria de la proteína.

Creemos que estos primeros experimentos orientados en este sentido tienen cierta significación si se confirman en otros sistemas y por otros autores. *No solamente podremos explicar ciertas reacciones de autoinmunidad por posible alteración terciaria paulatina del antígeno en combinaciones repetidas con el anticuerpo para originar "antígenos patológicos"* pero hasta, más especulativamente, suponer que en el control biosintético de las enzimas o, en el camino metabólico sujeto a auto-regulación, se presentan como pasos cruciales alteraciones moleculares semejantes a las aquí demostradas. Podemos suponer que una reacción proteína-antiproteína pudiera servir de control para regular la actividad de una secuencia metabólica al accionar mecanismos que alteraran la estructura terciaria de una o varias enzimas cruciales en ese camino metabólico.

Por ahora es muy prematuro postular este tipo de efecto como de significación fisiológica; sin embargo, por nuestra parte, pensamos continuar experimentos de este diseño en otros sistemas, tratando de analizar más completamente este punto.

Para concluir, y en resumen, hemos expuesto de un modo general las ideas actuales sobre la relación antigénica de algunas proteínas intracelulares de animales superiores. Los antígenos protéicos, que pueden por ahora analizarse, son de dos tipos principales; un cierto grupo de antígenos, cuyos representantes más claros serían las proteínas circulantes, se parecen a antígenos similares de otras especies y siguen, de manera bastante clara, un orden evolutivo. Otros antígenos, dentro de los cuales escogimos a las transaminasas glutámico-oxaloacético de hígado y corazón, que no son de distribución general en un organismo dado, sino que se localizan en sitios específicos dentro de la célula, comprenden el otro tipo de proteínas cuyo análisis comparativo pudiera dar datos fructíferos. Los resultados sugieren que son al menos dos antígenos molecularmente distintos dentro de cada célula, los responsables de transaminación. Cada uno de estos antígenos "fijo" es idéntico, con el criterio serológico y fisiológico utilizados, a las enzimas similares en otros órganos muy diferentes pareciendo entonces que su distribución es universal en todas las células del animal independientemente del origen

y función especializada propias de cada tejido. Esta situación reflejaría un cuadro de "identidad molecular del vertebrado", que a nuestro modo de ver, es compatible con una evolución económica de las proteínas en la naturaleza.

Finalmente hemos presentado en el sistema biológico analizado otros datos, que nos parecieron de interés por generar la idea de que ciertos anticuerpos, al menos del tipo antienzima, pudieran ejercer un efecto "desnaturalizante" sobre antígenos tisulares. Este mecanismo pudiera ser activo en la aparición de las enfermedades llamadas de autoinmunidad. Ese tipo de distorsión molecular protéica, por efecto de su unión con otra proteína complementaria, pudiera también tener significación en la regulación metabólica de la fisiología celular sobre todo donde las proteínas "reguladoras", del tipo de las postuladas por Jacob y Monod¹² participaran de manera importante.

REFERENCIAS

1. Boyden, A.: *Comparative Serology. Aims Methods and Results*. En: Serological and Biochemical Comparisons of Proteins, Ed., W. H. Cole., Rutgers University Press. N. J. (1958) p. 3.
2. Williams, C.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 71: 414, (1961).
3. Zuckerkandl, E. y L. Pauling.: *Molecular Disease, Evolution and Genic Heterogeneity*, en: Horizons in Biochemistry. Ed., M. Kasha y B. Pullman., Academic Press, N.Y. (1962) p. 189.
4. Ingram, V.: *Hemoglobin and its Abnormalities*. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. (1961) 153 pp.
5. Henson, C. P. y W. W.: Cleland., Biochemistry 3: 338 (1964).
6. Velick, S. F. y J. Vavra.: J. Biol. Chem. 237: 2109 (1962).
7. Evangelopoulos, A. E. e I. W. Sizer.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 49: 638 (1963).
8. Morino, Y. H. Kagamiyama y H. Wada: J. Biol. Chem. 239: PS 943 (1964).
9. Córdoba, F., A. Pérez y S. Estrada: Gac. Med. México XCIII, 875 (1963).
10. Fleisher, G.A., C.S. Potter y K.G. Wakim: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103: 229 (1960).
11. Ishizaka, K. y T. Ishizaka: J. of Immunology 85: 163 (1960).
12. Jacob, F., y J. Monod: J. Mol. Biol., 3: 318 (1961)

NOTA: Agradezco sinceramente la colaboración competente de la Srita Concepción González y del Dr. Aarón Pérez en la realización de estas investigaciones.