

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS  
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

---

# DISCURSO

LÉIDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN

POR EL

EXCMO. SR. D. JULIÁN SANZ IBÁÑEZ

Y

## CONTESTACIÓN

DEL

EXCMO. SR. D. GREGORIO MARAÑÓN

EL DÍA 7 DE MAYO DE 1952



MADRID

DOMICILIO DE LA ACADEMIA: VALVERDE, 22

TELÉFONO 21 25 29

1952

---

ES PROPIEDAD  
DERECHOS RESERVADOS

---

DISCURSO  
DEL  
EXCMO. SR. D. JULIÁN SANZ IBÁÑEZ  
TEMA: BIOLOGÍA DE LOS VIRUS

SEÑORES ACADÉMICOS:

Con emoción, expreso mi agradecimiento a la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, por haberme otorgado el gran honor de traerme a formar parte de ella y participar en sus trabajos. No puedo por menos de manifestar mi preocupación al verme, por vuestra bondad, junto a maestros eminentes de la Ciencia española, algunos de los cuales lo eran ya en mi época de estudiante, en la que la distancia agigantan, todavía más, las figuras preeminentes.

La seguridad en vuestro sereno juicio, me anima a iniciar la ardua empresa con empeño y entusiasmo, que es lo mejor que puedo ofrecer en esta desigual correspondencia.

La complejidad de la ciencia moderna hace cada vez más necesaria la cooperación de todos para desentrañar sus problemas. El gran desarrollo de la ciencia experimental, en todos los órdenes, nos inunda de hechos, muchos de ellos contradictorios, y son necesarios crítica fina y juicio sereno para seleccionar, ordenar y sistematizar el gran aluvión de resultados. Buena parte en esta tarea tienen las instituciones que, como ésta, reúnen en grado sumo estas cualidades.

No faltará a esta empresa mi esfuerzo, y pido a Dios me ilumine en la empresa que ahora inicio.

Por el número limitado de Académicos Numerarios, la presencia de uno nuevo implica la pérdida del que le precedió en el disfrute de la medalla. En este caso la ausencia es para mí doblemente penosa, por unirse, al dolor que produce la pérdida de un español ilustre, la de un amigo admirado y querido.

D. Juan Marcilla Arrázola, nacido en Madrid en 1886, tuvo la gran suerte, entre otras, de que coincidiera su vocación con el trabajo a que se dedicaba. Ingeniero Agrónomo en 1910, fué destinado a la Estación de Viticultura y Enología de Villafranca del Panadés, donde comenzó su especialización en estas materias, aplicando, por primera vez en España, los métodos electroquímicos al estudio de los vinos. Perfeccionados sus estudios en Suiza y Francia, pasó a la Estación Ampelográfica Central, participando en las experiencias sobre portainjertos americanos, encaminados a repoblar el viñedo español, gravemente dañado por la filoxera.

Pronto adquirió gran reputación como experto en vinos, por sus conocimientos de ellos y la excelente labor realizada en la organización y producción de las bodegas, a las que trajo nuevas ideas y procedimientos, que aseguraron el rendimiento y mejoraron sus productos. Puede decirse que gran parte del perfeccionamiento de los caldos españoles se debe a Marcilla.

Nombrado Catedrático de Viticultura y Enología de la Escuela Especial de Ingenieros Agrónomos en 1923-1924, desarrolló en su Cátedra una labor admirable. Su paso por la Escuela lo señala bien la creación, por su iniciativa, de la Cátedra de Microbiología Agrícola, que desempeñó desde el principio con entusiasmo y eficiencia, acogiendo, con verdadero celo, a todos los que querían trabajar, no escatimando tiempo, esfuerzo y conocimientos en la tarea de iniciar y orientar el trabajo de sus discípulos.

Sus explicaciones en clase eran claras, sencillas, ordenadas y precisas. De esta época mencionaremos, entre muchas, dos de sus publicaciones: *Vinificación en países cálidos* y *Defectos, alteraciones y enfermedades de los vinos*.

La Fundación Nacional para Investigaciones Científicas creó, en 1923, el Centro de Investigaciones Vinícolas al aceptar, entre varios temas de un concurso, el propuesto por Marcilla sobre levaduras que forman velo durante la "crianza" de vinos, nombrándole su Director.

Julio de 1936 le sorprende en Madrid, y supo de los sufrimientos y penas que le proporcionaron la profanación de sus sentimientos cristianos y padecer prisión. Trabajador infatigable y de

gran entereza, aprovechó la forzada quietud para escribir su obra *Viticultura y Enología*, consejero de todos los viticultores y enólogos, y premiada por el "Office International du Vin".

Pasada la contienda, se hizo cargo, como Director, de las ruinas de la Escuela Especial de Ingenieros Agrónomos, que transformó con tesón y entusiasmo en la actual, modelo de organización moderna.

Al hacerse cargo el C. S. I. C. del Centro de Investigaciones Vinícolas, lo transformó en la Sección de Fermentaciones en el Instituto Cajal. La labor realizada por Marcilla en ella es una prueba más de su capacidad. Amplió notablemente sus estudios sobre las fermentaciones cítrica, butílica e isopropilbutílica, y comenzó sus trabajos sobre "multiplicación de levaduras para pienso", en el que tenía puestas sus ilusiones, en su deseo, vehementemente sentido, de contribuir a la solución del problema de la alimentación del ganado. Animado por los resultados obtenidos, y por el rico contenido en proteínas del material, orientó sus esfuerzos a elaborar un producto apto para la alimentación humana.

Publicaciones de esta etapa son *Contribución al estudio de materias primas españolas para la síntesis microbiana de proteínas. Una mezcla de indicadores de pH para la industria enológica. Inoculación de semillas de leguminosas con bacterias radicícolas*, y otras que desarrolló también en el Instituto de Investigaciones Agronómicas y en el Departamento del Instituto Juan de La Cierva.

En reconocimiento oficial de su labor se le otorgaron las grandes cruces de Alfonso X el Sabio y Mérito Agrícola, justa recompensa a sus trabajos. También fué elegido Académico de Número de la Real Academia de Farmacia.

La estimación internacional del Profesor Marcilla era grande. Su muerte dió lugar a sentidos homenajes. En el Office International du Vin se designó a otro español para ocupar su puesto; en el Congreso Internacional de Viticultura y Enología, que se celebraba, a su fallecimiento, en Atenas, exaltaron su figura y reservaron su puesto para un compatriota suyo. En Portugal, la Estación Agronómica de Sacaven hizo mención especial en una Orden del día, en la que glosaba su labor y enaltecía su memoria.

En su trabajo no estaba solo, le acompañaban un grupo selecto de colaboradores que constituían y mantienen una escuela que él supo crear y afianzar. Sé bien que al mencionar en estos momentos a los que la forman: D. Jenaro Alas, compañero entrañable y discípulos Xandri, Feduchi, Santamaría, Ruiz de Asín, Srta. Aznar, y a su preparador Ríos, es el homenaje más grato que se le puede hacer.

Que su noble vida nos sirva de ejemplo y que él haya encontrado en el Señor el descanso que merece.

El tema que vamos a desarrollar es el problema biológico de los virus.

Es signo de los tiempos actuales el poderoso desarrollo de la investigación y la aplicación de las técnicas recientes más diversas al conocimiento de los problemas. Los virus no escapan a él. Hoy día es una de las ramas científicas que más rápida, diría tumultuosamente, se ha desarrollado y en la que se trabaja con pasión.

El conocimiento de las características de los virus rebasa el campo de la Patología, vegetal, humana o animal, para ser objeto de la física, química de las proteínas, y genética, con las que está en estrecha relación, sobre todo cuando estas disciplinas se ponen en contacto con el problema de la vida.

La unidad de la investigación virósica, su posición en las ciencias biológicas, está condicionada por la problemática y metódica de su trabajo.

Los hechos acumulados en los quince últimos años han revolucionado las ideas que, no hace más de cincuenta, habían servido para separar entre los microorganismos patógenos un grupo que PASTEUR y KOCH caracterizaron por su invisibilidad, paso a través de los filtros y multiplicarse sólo en las células vivas.

El estudio científico de los virus se inicia en 1886, cuando ADOLFO MEYER demuestra la infecciosidad del jugo obtenido por aplastamiento de las hojas de tabaco afectadas de la enfermedad del mosaico del tabaco, y la pérdida de aquélla por ebullición. El 12 de febrero de 1892 comunicaba IWANOSKY a la Academia de Ciencias de San Petersburgo sus trabajos sobre el mosaico del tabaco, en los que confirmaba los resultados de MEYER en cuanto a la infecciosidad y discrepaba en los de la filtración. Para MEYER, bastaba la



filtración por doble papel de filtro para obtener líquidos no infecciosos. El investigador ruso demuestra que no es así, que el agente infeccioso es capaz de atravesar, incluso, las bujías de Chamberland. En su primer trabajo, IWANOSKY no atribuye la enfermedad a un agente más pequeño que las bacterias. La virulencia de los filtrados sería debida a una toxina, eliminada por la supuesta bacteria, o a un defecto de la bujía de filtración. En un trabajo aparecido siete años después, sobre todo para recabar la prioridad del experimento de la filtración a M. W. BEIJERINCK, señala que le ha sido factible transmitir la enfermedad, largo tiempo, de planta a planta; deduce por esto que el agente filtrable se multiplica en las plantas vivas. No obstante, sigue aferrado a la idea del origen bacteriano, como claramente lo demuestra su expresión: *que apenas se puede dudar la naturaleza bacteriana del contagio.*

En 1885 tuvo ocasión BEIJERINCK de participar con MEYER, en la Escuela Agrícola holandesa de Wageningen, en las experiencias sobre el mosaico del tabaco. Después de su famoso descubrimiento de las bacterias de las leguminosas, se dedicó al estudio de la naturaleza y cultivo del agente productor de la enfermedad del mosaico del tabaco. Por los fracasos repetidos de cultivo en medios aerobios y anaerobios, llegó a la conclusión que la enfermedad del mosaico del tabaco había que considerarla como una enfermedad infecciosa no producida por microbios, sin hacer mención alguna que fuese debida a microorganismos submicroscópicos no cultivables. En trabajos posteriores llega a la conclusión de que el contagio es un *contagium vivum fluidum*, en el que va implícitamente admitida la multiplicación del virus.

LÖFFLER y FROSH, en sus estudios sobre la fiebre aftosa, llegaron a la conclusión que el agente contenido en la linfa era un veneno soluble o un microorganismo específico de pequeño tamaño, capaz de pasar a través de las paredes de los filtros que retenían las bacterias más pequeñas entonces conocidas.

Intentaron obtener una vacuna contra la fiebre aftosa, eliminando por filtración los elementos corpusculares, con objeto de que el filtrado no fuera infeccioso, pero conservase los materiales inmunizantes solubles. Al eliminar la posibilidad de que se tratase de una to-

xina, apuntaron la idea de que se trataría de un elemento específico submicroscópico con capacidad de multiplicación.

Al generalizar su concepto manifestaron que los agentes de otras muchas enfermedades infecciosas del hombre y de los animales, viruela, escarlatina, sarampión, etc., pertenecerían a un grupo de organismos que se caracterizaría por su pequeño tamaño.

Como consecuencia de los trabajos de los cinco investigadores señalados, se llegó a las siguientes conclusiones:

1.<sup>a</sup> La existencia de agentes patógenos no demostrables microscópicamente que podían transmitirse ilimitadamente de un huésped a otro.

2.<sup>a</sup> El material infeccioso se multiplicaría en los organismos receptibles, pues de otra manera no se comprendería la transmisión ilimitada y la acción patógena en inoculaciones con cantidades más pequeñas.

3.<sup>a</sup> No serían capaces de multiplicarse fuera del huésped receptible.

4.<sup>a</sup> Atravesarían las paredes de los filtros que retenían los microorganismos más pequeños conocidos (bacterias).

Durante un tiempo se perfiló bien el grupo de los virus por los caracteres indicados. La aplicación de las modernas técnicas físicas a su estudio fué desmoronando el grupo y haciendo inaplicable estas características para su identificación.

Los notables trabajos de filtración de ELFORD demostraron que el paso del virus depende, entre otros factores, como la carga eléctrica, por ejemplo, del tamaño del poro. Esta técnica física, a la vez que nos eliminaba una peculiaridad, nos proporcionaba datos precisos sobre el tamaño de los virus, al ponerlo en relación con el del poro de la membrana que lo retenía.

La ultracentrifugación complementa a la filtración y facilita virus muy purificado, imprescindible para llegar a conocer con precisión sus características.

El microscopio electrónico, al visualizar a muchos virus, ha eliminado una peculiaridad que al principio de la era bacteriológica permitía deslindar el campo de los agentes invisibles y visibles.

Como se ve, sólo queda la patogenicidad y la necesidad impres-

cindible de células vivas por su multiplicación, hoy en entredicho, como característica de los virus.

Este parasitismo obligado ha dado lugar a buen número de hipótesis sobre su origen. Mencionaremos brevemente las más importantes.

En general, podemos clasificarlas en dos grandes grupos: los que consideran que la causa de la enfermedad específica sería endógena y los que, en contraposición a éstas, creen es exógena.

La teoría endógena considera que los virus se producirían en ciertas alteraciones patológicas de las células. Las causas de estas modificaciones podrían ser específicas o inespecíficas; en el primer caso se trataría de la penetración de un virus en el huésped, donde viviría como parásito; en el segundo, de una modificación patológica del metabolismo celular, provocada por causa inespecífica, que originaría la formación de una proteína específica de alto peso molecular.

Esta teoría tiene que aclarar el por qué un agente causal, sin capacidad de multiplicación, puede ser transmitido en serie ininterrumpida de animal a animal, o de planta a planta.

A esta hipótesis se le hace la objeción que excitaciones de muy diversa índole dan lugar a una proteína vírica específica, cualquiera que sea, por otra parte, la clase de células sobre las que actúan. Es difícil comprender cómo una modificación patológica del metabolismo puede producir la misma proteína-virus, en la piel del hombre o en el cerebro del conejo.

Los estudios inmunológicos han demostrado idénticas reacciones para la proteína-virus que para los preparados de las albúminas de las plantas huéspedes. Las plantas enfermas poseen antígenos víricos que no tienen las normales. Estas sustancias antigénicas se producen en cuantía suficiente para producir anticuerpos, demostrable por reacciones serológicas.

Por otra parte, los antígenos víricos son peculiares para cada clase de virus e identificables por los antisueros específicos.

STANLEY cree que la infección vírica consiste en la introducción de algunas moléculas de proteína-virus en un huésped recepti-

ble; esta pequeña cantidad de molécula vírica sería bastante para influenciar el metabolismo de las células del huésped, de tal manera que éstas producirían proteína-virus en vez de albúmina normal. En esta modificación del metabolismo celular es donde hay que buscar la causa y esencia de las enfermedades producidas por virus.

Lo sorprendente es que los virus macromoleculares no son otra cosa que proteínas de alto peso molecular en dispersión molecular en solución; que las hojas de la planta enferma del tabaco producen dos veces más cantidad de proteína que las normales, y que el 80-90 por 100 de este alto contenido proteico son macromoléculas de proteínas-virus. Según esto, no sólo habría un aumento de proteínas anormales, sino también una notable disminución de las normales; ambos procesos en íntima y recíproca relación.

La teoría endógena de los virus tendría un buen apoyo si las proteínas-virus fuesen de la misma naturaleza, o próxima, a las proteínas normales del huésped. Los estudios realizados en este sentido, por medio de las reacciones de desviación de complemento y anafilácticas cruzadas (Chester), demostraron que los preparados de proteínas-virus estaban impurificados con albúminas normales. Además, cuando para evitar esta impurificación se empleaban proteínas-virus muy activos y puros, había casos que no daban la reacción cruzada.

Es difícil aceptar variaciones en las moléculas víricas, porque las razas de virus son bastante constantes y no pasan unas a otras de un modo regular. Por otra parte, la formación de proteínas-virus desviadas de la cepa original, daría lugar a una participación del citoplasma de las células del huésped, necesario para la síntesis de las proteínas-virus de la cepa con la que se hizo la inoculación.

La concurrencia de varios virus de diferente naturaleza en una misma planta demuestra la posibilidad de producir en las células diversas moléculas de virus por modificaciones del metabolismo proteico. En esta alteración metabólica se originarían proteínas de alto peso molecular que serían las proteínas-virus de cada uno de los virus inoculados. Tenemos ejemplos de esta concurrencia vírica en la doble inoculación de la patata, con los virus X e Y, así como del tabaco con los del mosaico y de las manchas en anillo.

KOHLER ha conseguido aislar cuatro variantes, de una misma

cepa de virus del mosaico X de la patata, que se diferencian por la intensidad y naturaleza de las acciones patógenas que desarrollan, debidas a una modificación brusca de las moléculas de virus-proteína, que consiste en la asociación y disociación de partes de la misma naturaleza. La polimerización aumentaría la patogenicidad del virus por el mayor *quántum* del mismo; la despolimerización, por el contrario, al disminuir la cantidad, la debilitaría.

Este punto podría aclararse haciendo la medición de las partículas víricas de cada una de las cuatro variedades, experimento que todavía no se ha hecho.

La diferencia entre la interpretación de KOHLER y la de STANLEY es que las variaciones del virus serían puramente cuantitativas para el primero, y cualitativas para el segundo, y por eso las compara con las mutaciones genéticas.

Para WOLLMAN los virus se originarían en el organismo por una mutación de los genes, producida por una excitación. La transmisión hereditaria de esta mutación sería la causa de la lisis microbiana. La objeción más seria que se ha hecho a esta teoría es la de que no es posible admitir que los genes mutados puedan vivir fuera del organismo, porque sería tanto como aceptar que los cromosomas, soportes materiales de los caracteres mutativos, pueden vivir independientes fuera de las células. Por otra parte, las investigaciones en los vegetales demuestran que las virosis no se transmiten hereditariamente por los genes, como tendría que ocurrir si virus y genes fuesen entidades equivalentes.

BOIVIN acepta que los virus tienen una constitución macromolecular, y se pregunta si los seres vivos no podrían reducirse a una sola molécula gigante por la talla y estructura química, así como también por la posibilidad de emigrar. Sugiere la posibilidad de que los virus se originen al principio de algún gene nucleoproteico característico de una especie, animal o vegetal, y que este gene modificado sería inoculado por un parásito a otra especie, en la cual, a su vez, daría lugar a la producción de la nucleoproteína específica, al encontrar allí células en las que se multiplicaría libre y abundantemente, por encontrar en ellas las condiciones favorables para ha-

cerlo. Según esto, un virus sería una nucléoproteína que habría perdido su localización natural.

Según la hipótesis del virus catalizador, los virus serían catalizadores que, al ponerse en contacto con las células receptoras, desencadenarían la catálisis de ciertos componentes químicos indispensables para la vida celular. Esto explica la existencia previa en los organismos animales o vegetales, de los que podríamos llamar provirus o probacteriófagos. Esta teoría, basada principalmente en los virus vegetales y en los bacteriófagos según las experiencias de DIXTON para los primeros, y NORTHON para los segundos, está descartada por los virólogos, porque las células receptoras, al enfermar, producen nucléoproteínas víricas idénticas a las del agente que las provoca y no nucléoproteínas activadas por los catalizadores.

Desorbitando un poco el problema, MORILLANA establece la semejanza entre la "caseinasa" (diastasa coagulante de la caseína) y los virus, al afirmar que aquélla podría considerarse como un virus derivado de la proteína de las células gástricas, con la peculiaridad de no ser patógeno.

LEVADITI, gran conocedor de los virus, se mostró partidario decidido de la doctrina de PASTEUR, del origen exógeno de las enfermedades víricas. El virus provendría siempre del exterior, y al ponerse en relación con las células susceptibles se multiplicaría intensa y rápidamente, dando lugar, o bien a la desintegración y lisis de las mismas (virus lísico), o a una intensa proliferación celular (virus neofornativo).

Para poder comprender bien la naturaleza de los virus y sus génesis, es necesario tener en cuenta, según LEVADITI, las tres premisas siguientes: 1.<sup>a</sup> Los virus son incapaces de germinar y proliferar *in vitro* a expensas de los principios que constituyen los medios corrientes de cultivo. 2.<sup>a</sup> Los virus nucléoproteínas, al igual que los virus en general, provocan en las células receptoras, que contaminan, la síntesis de nucléoproteínas víricas que son diferentes, física y químicamente, de las nucléoproteínas de las células sanas. 3.<sup>a</sup> Esta diferencia se caracteriza porque el organismo infectado reacciona frente al virus con la elaboración de anticuerpos específicos, demostrables por las reacciones inmunológicas.

LURIA define los virus "como una unidad submicroscópica exógena capaz de multiplicarse solamente en el interior de células vivas específicas". Esta definición proporciona una unidad metodológica al campo de la virología y elimina dos grupos límites: el de los microbios parásitos obligados y el de los componentes protoplasmáticos transmisibles sólo por injerto (GRAFT).

Recientemente se ha aplicado a los virus la teoría de los sistemas abiertos de BERTALANFFY, que proporciona, aplicada a la biología, leyes cuantitativas a los fenómenos biológicos más importantes.

Según esta teoría, los organismos vivos, desde un punto de vista físico, tienen los caracteres de los sistemas abiertos, en los que se opera continuamente un recambio de materiales entre las células que las componen y los medios que las circundan, traducido en un deshacer y rehacer de sus componentes. Las células del organismo como totalidad no están nunca en un verdadero equilibrio, sino en "estado estacionario", y por eso se considera al organismo como un "equilibrio dinámico".

Una gran diferencia entre los sistemas vivos y los inanimados puede expresarse por el concepto de "equifinalidad". En los sistemas iniciales físicos el estado final está determinado por las condiciones iniciales. Si éstas varían, varía también el estado final. Los fenómenos vitales se comportan de distinta manera. Al estado final puede llegarse, iniciándose el proceso en condiciones muy diferentes y por mecanismos diversos. A esta especial manera de realizarse los fenómenos en los sistemas vivos se denomina "equifinalidad".

Basado en un fundamento análogo, DESLINGER llega, en 1935, a una conclusión diferente. Según la fórmula diferencial de BERTALANFFY, el aumento de masa es igual a la toma de material nutritivo por la superficie, menos el consumo del interior, que es proporcional a la masa total. El estado estacionario supone un mecanismo de regulación muy complicado, por el que el material nutritivo que llega a la superficie se reparte regularmente por el interior, independiente-

mente del tamaño. En los organismos superiores este mecanismo está representado por la circulación sanguínea. Pero ¿cuál es en los organismos más primitivos? En primer lugar, debe depositarse el material nutritivo en su proximidad para que penetre en el interior por difusión u otro mecanismo análogo. Al crecer el organismo, será cada vez más largo el camino interior, y menor, por unidad de tiempo, la cantidad de alimento, por lo que las reacciones químicas, necesarias para la vida interior, disminuirán paulatinamente. El consumo no es ya proporcional a la masa total; la masa se iguala a una capa de la superficie. El organismo crecerá sin alcanzar un límite y no habrá estado estacionario. Para evitar la muerte del interior sólo hay una posibilidad: la división, de tiempo en tiempo, para multiplicar la superficie.

La división más sencilla tiene lugar cuando se hace a lo largo de un plano, formándose cada vez dos partes. Para esto es necesario que el crecimiento y disposición del material que ha difundido en el interior, y debe provocar la división, se sitúe en capas paralelas a esta superficie o plano.

Según DESLINGER, la forma más sencilla, en la que a pesar de realizarse una reacción química constante permanece el modelo casi estacionario, es el cristal unidimensional. Consiste en un número variable de moléculas (grupos de átomos) de la misma naturaleza, agrupadas sucesivamente; en él se verifica una difusión desde el exterior y es capaz de división.

La concepción de los sistemas abiertos ha sido aplicada por DESLINGER y WERTZ a las unidades biológicas elementales capaces de automultiplicación, como los virus, genes y cromosomas. BERTALANFFY cree que los virus y genes son cristales aperiódicos metabolizantes. En los procesos de degradación se originan piezas repulsivas que pueden conducir a la división y automultiplicación. Esta idea parece estar apoyada, en lo que se refiere a los cromosomas, por las investigaciones con fósforo radioactivo como trazador, en las que se demuestra que los núcleoproteidos de las células están en continua degradación y regeneración.

Crecimiento y división son las dos características de los sistemas físicoquímicos cuasi estacionarios. Estas dos propiedades las poseen



también los organismos biológicos más primitivos hoy conocidos: los virus. La diferencia entre éstos y los sistemas estacionarios, teóricamente desarrollados, consiste en que los virus crecen solamente en las células vivas; esto es, en un medio nutritivo extraordinariamente especializado.

Toda forma orgánica es la expresión de una sucesión de procesos en un sistema ordenado de fuerzas. Esta sería la base de la llamada "morfología dinámica", cuya concepción ha sido aplicada a buen número de problemas, entre los que destacaremos el estudio analítico cuantitativo del crecimiento de los microorganismos, virus, gradación del crecimiento, etc.

**Tamaño, forma, estructura y clasificación.** Expondremos a continuación los datos que poseemos sobre tamaño, forma y estructura.

*Tamaño.* — La aplicación de los métodos físicos, anteriormente indicados, a la determinación del tamaño de los virus, nos han proporcionado una gran variedad de tallas que oscilan entre 10 m $\mu$  y 450 m $\mu$ . El virus más pequeño es el de la fiebre aftosa, 10 m $\mu$ ; el mayor, el de la psitacosis, 450 m $\mu$ ; entre ellos, una gradación de tamaños como lo demuestran el de la fiebre amarilla, 22 m $\mu$ ; parálisis infantil, 25 m $\mu$ ; mosaico del tabaco, 15  $\times$  250 m $\mu$ , y vacuna, 115 m $\mu$ .

El tamaño del virus más pequeño se relaciona con el de las grandes moléculas. El de los más grandes, con las formaciones citoplásmicas, mitocondrias y microsomas.

Para tener una idea del tamaño de los virus, daremos la medida transversal de los corpúsculos elementales de los de la vacuna y psitacosis, 1.750 Å y 2.750 Å, respectivamente. Las rickettsias, con 3.000 Å, son el puente de unión, en la escala de tamaños, entre los virus y los microbios pequeños, como los estafilococos, que tienen 8.000 Å. Si tenemos presente estos tamaños, no nos sorprenderá que los grandes virus puedan ser detenidos por los filtros de poros que no dejan pasar a las bacterias.

*Forma.* — Son muy variadas. En general se presentan como esferas aisladas o dispuestas en hileras, paquetes, filamentos, bastoncitos, mazas, etc.; esto es, reproducen la morfología de las bacterias, pero en miniatura. El del mosaico del tabaco, cristalizable de las soluciones, está compuesto regularmente de partículas (unidades) más pequeñas que se pueden aislar modificando el pH del medio. Las partículas aisladas pueden recombinarse y reproducir de nuevo la forma primitiva, pero sin actividad biológica.

Las partículas víricas en solución son de forma bastante recta; tienden a la de ovillo en la desecación. En los estudios hipermicroscópicos se ven partículas redondas, no completamente compactas y regulares.

Las formas redondas corresponden a una ovillación completa: las de palillo de tambor, a fases intermedias entre las de ovillación y las rectas.

Los virus con corpúsculos elementales de gran tamaño, algunos visibles con el microscopio corriente, se denominan "virus grandes". Pertenecen a este grupo el de la psittacosis, viruela-vacuna, virus de Gönnert de la bronconeumonía de los roedores y el de la neumonía del hombre. Es importante señalar que los agentes productores del grupo del tifus exantemático se incluyen hoy día en el grupo de las rickettsias, aunque hay quien los considera como verdaderos virus.

Las diferencias entre virus grandes y pequeños no se limita sólo al tamaño. Según las investigaciones más recientes, con el hipermicroscopio, resulta verosímil, ya que no cierto, que los grandes virus son, por lo menos, parcialmente organizados, y tienen una naturaleza celular análoga a la de las bacterias. Por esto podemos separar los grandes virus organizados de las otras clases de virus, cuyos corpúsculos elementales están formados por macromoléculas y supermoléculas, llamados simplexes, y denominados por RUSKA (1944) virus moleculares.

EYER y RUSKA han demostrado, sin duda, el carácter organizado de las rickettsias, por presentar una estructura celular análoga a la de las bacterias y poseer una membrana que se distingue bien del citoplasma.

HASB no duda en intercalar las rickettsias entre las bacterias y los virus.

Por las investigaciones hipermicroscópicas de RUSKA y POPPE (1947) del virus de Gönnert, sabemos que se trata de formas vesiculosas de constitución celular; se diferencian de las bacterias y rickettsias por la falta de membrana celular. El límite del corpúsculo sería una fina membrana formada por una capa límite del citoplasma. Aparecen como células desnudas, de pequeño tamaño, filtrables. Para RUSKA, se trata de una nueva clase de microorganismos para los que propone la denominación de "cisticetos" por su organización celular.

El género *Cystidium* estaría formado por las clases *Gonmertianum*, *C. Seiffertianum* y *C. Borrelianum*; este último, el agente de la pleuro o perineumonía del buey.

El problema es más difícil de resolver para los virus de la viruela-vacuna y psittacosis. El corpúsculo elemental del virus-vacuna podría ser un simplex; esto es, una estructura supermolecular formada por una parte núcleoproteica y otra lipóide. El glúcido encontrado procede, indudablemente, del ácido nucleínico. Este virus no tiene composición molecular, y el carácter simplex es también dudoso, porque los corpúsculos disponen de enzimas al tener una actividad fermentativa. Según las últimas investigaciones de MCFARLANE (1950), las observaciones con el hipermicroscopio permiten asegurar que los corpúsculos elementales de vacuna tienen núcleo y citoplasma. El virus de la psittacosis es más difícil de catalogar. La tendencia más marcada es a considerarlo de naturaleza microbiana, según hizo su descubridor (LEVINTHAL). Aboga en favor de esta opinión el que el ácido nucleínico que contiene es del tipo dexosy-ribosa, según ROBINOW y BLAND (1938).

Desde el punto de vista terapéutico tenemos el hecho interesante que las infecciones debidas a los grandes virus responden a la quimioterapia con sulfonamidas. KIKUTH (1943), RUSKA y POPPE (1947) lo incluyen en el grupo de los "cisticetos".

El límite entre ambos grupos hay que basarlo en la estructura de los corpúsculos elementales de los virus, principalmente en si tienen o no estructura celular. La denominación "virus" no representa

un concepto sistemático. Es un nombre común a un grupo muy heterogéneo.

Debemos distinguir claramente los virus eu-virus de los virus falsos o pseudovirus. Estos últimos se diferencian de los primeros, que tienen carácter macromolecular o simplex, por su organización celular, y es más lógico incluirlos en el grupo de los cisticetos de RUSKA y POPPE.

Esta diferencia entre virus y pseudovirus es trascendental, porque en los primeros tenemos que ver no ya un grupo especial de microbios que se diferencia por el tamaño, sino un principio de organización distinta, que no tiene carácter celular.

Con otras palabras: los eu-virus pertenecen a la zona molecular. Como ha dicho JAURENN, refiriéndose al virus de la fiebre aftosa, "este virus, según sus propiedades, es una partícula de albúmina sin vida y no un microorganismo más pequeño".

### **Virus puros y moleculares. Composición química.**

En el Congreso de Londres de 1935, STANLEY asombró a los congresistas con su célebre comunicación sobre "Actuación del jugo de las hojas del tabaco enfermas por el mosaico", en la que demostró que una proteína cristalizada era infecciosa en la pequeña cantidad de  $10^{-9}$  gr.; asombro que subió de punto cuando BAWDEN y WEST dijeron que lo habían confirmado. Posteriormente STANLEY y WYKOFF lo ampliaron a otros virus de plantas, de las que consiguen proteínas-virus de altos pesos moleculares, y BAWDEN y PIRIE (1937) demostraron que el material activo no es una proteína ordinaria, sino una núcleo-proteína.

Entre los virus animales, el primero del que se aisló una proteína de este tipo fué el del papiloma del conejo, de Shope.

Los hechos en que se apoya STANLEY para demostrar la naturaleza vírica de la proteína aislada son los siguientes: 1.º La constancia de las propiedades biológicas, físicoquímicas y serológicas, sea cualquiera el método que se emplee para su aislamiento. 2.º La imposibilidad de separar de la proteína la acción patógena del virus.

3.º Que toda alteración de la proteína lleve consigo la pérdida de la acción específica del virus. 4.º La homogeneidad de la proteína en relación con el tamaño de su partícula y con el punto isoeléctrico. 5.º La coincidencia del espectro de absorción del virus con el de la proteína (DUYGER y HOLLANDER).

Los trabajos de STANLEY, en los que demuestra que los corpúsculos elementales de los virus son macromoléculas de nucleoproteínas, idea no admitida por todos, señalan un punto de partida en el estudio de los virus, que se ha caracterizado por la obtención de material purificado para así poder estudiar su composición química.

La mayor parte de las veces están los virus impurificados, a pesar de purificaciones repetidas con material procedente del huésped. Así, por ejemplo, los preparados purificados del virus de la influenza presentan impurezas del tejido de ratón, cuando se hace el cultivo en pulmón de este animal o de las diversas partes del huevo incubado de gallina, si se emplea este medio de cultivo. En todos los casos puede demostrarse la naturaleza de las impurezas por reacciones serológicas y químicas.

Para algunos, las partículas de virus serían material activo del huésped diferenciable serológicamente. Otros, por el contrario, consideran como verdaderas impurezas las substancias que proceden del huésped.

La cuantía de estas impurezas es grande. GAMON, PICKELS y HOSSFALL han estudiado este punto y demostrado que el tamaño del virus de la influenza aislado de pulmón de ratón es de  $140 \mu$ ; este mismo virus, purificado, tiene un tamaño de  $40 \mu$ ; la diferencia de  $100 \mu$  corresponde al material del pulmón del ratón.

Los pesos moleculares de las proteínas-virus investigadas oscilan entre  $9 \cdot 10^6$  para los virus del mosaico de la patata (LORING y WYCKOFF, STANLEY y WYCKOFF), y  $40 \cdot 10^6$  y  $42,5 \cdot 10^6$  para la proteína-virus del mosaico del tabaco (SCHRAMM-BERGOLD y PANFER); la medida transversal de la molécula oscila entre  $25-45 m\mu$ , si la molécula es esférica. Posteriormente se ha visto que las proteínas-virus son alargadas, fusiformes o en bastoncito, en las que la longitud es múltiplo de la anchura.

Uno de los más pequeños es el bacteriófago del estafilococo,

con un peso molecular de 500.000, según las investigaciones de NORTHROP.

El corpúsculo elemental mejor estudiado es el de la molécula filamentosa del virus del mosaico del tabaco. Según SCHRAMM y BERGOLD (1947), el peso molecular sería lo menos de  $40 \cdot 10^6$ , mucho mayor que el de la edestina y hemocianina, que tienen 309.000 y 6.700.000 en su valor más alto, respectivamente. La longitud de la molécula filamentosa del mosaico es de 2.800 Å, y está formada (BUTENANDT, 1947) por 40 discos transversales, dispuestos en el sentido longitudinal de la molécula, como una pila de monedas. Cada disco está compuesto, a su vez, de tres "células elementales" romboédricas. La fragmentación transversal y longitudinal de esta molécula nos proporciona, según SCHRAMM, moléculas de tamaño cada vez más pequeño. La unidad de los fragmentos y del resto que queda abogan en favor de que la molécula total es un múltiplo de las unidades más pequeñas. Según esto, la molécula está formada de tres componentes o fragmentos que tendrían un peso de 14.800.000, 360.000 y 120.000. El fragmento de 14.800.000 originaría, al dividirse en dos mitades iguales, dos partículas de 7.400.000.

La composición de la molécula filamentosa podemos deducirla de los fragmentos que de ella se obtienen. Cada molécula total de  $40 \cdot 10^6$  se fragmenta en 6 partículas de peso de  $7,4 \cdot 10^6$ . De estos fragmentos se obtienen otros, por fragmentación longitudinal, de un peso de 360.000, y éstos, a su vez, dan lugar, por fragmentación transversal, a 3 de 120.000.

La molécula total del virus del mosaico del tabaco estará formada, por tanto, por 6 unidades de  $7,4 \cdot 10^6$ , 108 unidades de peso de 360.000 y 314 de 120.000. De un modo general podemos decir que la estructura de la molécula del virus del mosaico del tabaco es regular en el sentido de que las partes que la forman se disponen a modo de red. La molécula se origina por la agrupación nuclear de unidades más pequeñas de igual naturaleza. Estas estructuras moléculonucleares pueden superponerse a la disposición paracrística de los agrupados moleculares.

El análisis de la molécula del virus no se limita al estudio de esta fragmentación, sino que trata de fijar el sitio donde se halla el ácido nucleínico. Según SCHRAMM, en la molécula compuesta de 6 componentes sólo contendrían ácido nucleínico algunas fracciones de 360.000, estando libres las demás.

Estos hallazgos justifican la idea de que únicamente contienen ácido nucleínico las partículas de 360.000, que están situadas en la superficie de la molécula del virus.

El ácido nucleínico se une a los grupos libres de las cadenas laterales básicas de las proteínas. Esta unión se hace por medio de los restos de los ácidos fosfóricos de los ácidos nucleínicos, teniendo las moléculas carácter de sal.

Según KNICHT (1947), el virus del mosaico del tabaco contiene como aminoácidos básicos, arginina (9,8 por 100) y lisina (1,5 por 100), calculándose en 22.500 y 4.100, respectivamente (en total, 26.600), el número de grupos aminos libres.

Según KAUSCHE y HAHN (1948), las proteínas sin ácido nucleínico contienen el 100 por 100 de los grupos calculados. En el virus nativo, de los 26.600 grupos básicos calculados teóricamente, sólo son demostrables 14.200 (54 por 100). A esto se enfrentarían  $12.000 \pm 2.000$  grupos ácidos, que suponen una buena relación entre el número de grupos básicos y ácidos.

Entre los virus patógenos del hombre y animales, es el de la vacuna el primero en el que se estudió la composición química de los corpúsculos elementales purificados. La purificación fué realizada por RIVERS y colaboradores, por centrifugaciones sucesivas. El estudio químico del material obtenido dió que los corpúsculos de la vacuna están compuestos de carbohidratos, ácido timonucleínico, diversas proteínas diferenciables serológicamente, cobre, biotina y riboflavina.

En las observaciones con el hipermicroscopio aparecen los corpúsculos del virus de la vacuna como estructuras cuboideas con membrana limitante y varios núcleos de condensación.

El virus vacunal purificado no posee actividades respiratorias, metabólicas o reproductivas en ausencia de células vivas. Esto demuestra que los virus animales son estructuras complejas completa-

mente diferentes, en cuanto a su composición, de algunos virus de las plantas que están formadas sólo por núcleoproteínas.

Por nuestra parte, hemos purificado el virus SK de poliomielitis, por medio del metanol. La observación con el hipermicroscopio, de material purificado y con patogenidad comprobada, nos permitió ver formas filamentosas que coincidían con las descritas por GARD para el virus de la parálisis infantil.

Las experiencias y resultados realizados por STANLEY con la proteína-virus plantea el problema de modo diferente a como estaba hasta entonces: en lugar de tender a conseguir virus "libres de proteína", se trata de obtener proteínas como virus.

El camino iniciado por STANLEY era extraordinariamente atractivo para que no fuese seguido por la mayor parte de los virólogos, ya sean químicos, físicos o biólogos, que se ocupen de determinar la naturaleza y características de los virus. STANLEY trata de generalizar la idea de "proteína-virus" y hacerla válida para los virus que tienen un tamaño más pequeño que el del mosaico del tabaco o del papiloma de Shope.

Hoy día está bien establecida la existencia de proteínas específicas en las plantas infectadas por varios virus. En general, se consideran como los propios virus. Algo aventurado es el identificar las proteínas purificadas, obtenidas de las plantas infectadas, con las partículas de virus. Es más prudente considerar estas proteínas como las formas más simples de los virus que conservan su propiedad característica: el poder infectar a células receptoras. Es necesario subrayar el poder infeccioso, por obtenerse de las plantas infectadas algunas partículas que no lo son.

Los virus cristalizados presentan una gran homogeneidad y se les ha denominado también virus moleculares; palabra inadecuada porque no tiene en cuenta la variabilidad de los virus, así como la modificación de sus propiedades, principalmente su comportamiento *in vitro*.

No existe razón alguna para aceptar que son idénticas todas las partículas de una misma preparación, hecho imprescindible para poder aceptar la denominación de molécula. Por el contrario, las preparaciones purificadas, por uniformes que parezcan, están for-



madras por una mezcla de partículas de distintas propiedades biológicas, demostrables por pruebas químicas, físicas y serológicas. Por otra parte, los virus se caracterizan más por las modificaciones de su estructura y variabilidad que por la fijeza.

*Propiedades de los virus purificados.* — Son muy diferentes las propiedades generales de los virus hasta ahora purificados. Las partículas presentan formas y dimensiones distintas: unas son estables y otras no; ciertas de ellas son cristalinas y algunas se presentan como cristales líquidos. Un hecho común a todas ellas es que se trata de núcleoproteínas que contienen un ácido de tipo ribonucleínico. El glúcido es, en general, la ribosa, según ha demostrado, para el virus del mosaico del tabaco, SCHWERDT y LORING (1947), quienes han aislado tres nucleótidos: los ácidos uridílico, cistidílico y guanídico, idénticos a sus homólogos del ácido nucleínico de la levadura. Muy probablemente las partículas de virus no contienen más que ácido nucleínico y proteína, por haber una estrecha relación entre la cantidad de ácido nucleínico demostrado y el contenido en fósforo.

Los virus que se aproximan al del mosaico del tabaco, por su escaso contenido en ácido nucleínico, se parecen también por la propiedad de formar partículas en forma de bastoncito, con tendencia a disponerse en cadenas lineales, mientras que los que contienen mayor cantidad de este ácido suelen aparecer bajo la forma de partículas esféricas sin tendencia a la agregación.

Esta diferencia a aglutinarse o no de las partículas de los virus hace pensar en que el ácido nucleínico estaría ligado de distinta manera en cada uno de los grupos. En los virus del mosaico del tabaco y el X de la patata el ácido nucleínico se pone en libertad por la desnaturalización por el calor, en tanto que permanecen en el coágulo proteínico el de los virus del *Bushy-stunt* del tomate, de la necrosis del tabaco y del mosaico del albaricoque (BAWDEN, PIRIE y MILLER). El ácido nucleínico obtenido a partir del virus aparece como grandes partículas anisométricas, birrefringentes y de igual peso molecular: alrededor de 300.000. Estas partículas se reducen con facilidad a un peso molecular de 15.000. COHEN y STANLEY han hecho notar que las grandes partículas polimerizadas son demasiado largas para que se dispongan las partículas de virus en sentido longitu-

dinal. Suponen que el ácido nucleínico está fijado a lo largo de los bastoncitos, en la superficie o muy cerca de ella. Este tipo de unión artificial explicaría la facilidad de liberación del ácido nucleínico. En algunos virus, como en el mosaico amarillo del navet (MARKHAN y SMITH, 1948), están formados en un 80 por 100 por núcleoproteínas y el resto por partículas proteínicas sin ácido nucleínico.

En la mayor parte de los virus el ácido nucleínico está sólidamente fijado y no puede separarse de la mitad proteínica más que por procedimientos de desnaturalización bastante enérgicos (BAWDEN).

Las partículas que no contienen ácido nucleínico existen en proporciones constantes en las preparaciones, y serían proteínas nativas diferentes de las desnaturalizadas, por ejemplo, por el alcohol. No son infecciosas y sedimentan más rápidamente que las núcleoproteínas, a las que se parecen mucho. Tienen las mismas dimensiones que las proteínas, con las que forman cristales mixtos; poseen la misma movilidad electroforética y contienen los mismos antígenos. Esta semejanza entre ambas partículas hace suponer, según MARKHAN y SMITH, que el ácido nucleínico se encuentra situado en el interior de la partícula del virus y rodeado de una corteza de proteína.

En todo momento debemos tener presente que no hay relación entre el tamaño del virus y sus caracteres biológicos; virus estrechamente relacionados por su biología, tienen muy diferentes tamaños; por ejemplo, los virus de la estomatitis y de la fiebre aftosa.

Para que una proteína sea considerada infecciosa no basta que tenga un alto peso molecular; es necesario que sea capaz de multiplicarse en el organismo huésped receptible y conservar sus propiedades específicas.

Como ejemplos de moléculas albuminoides gigantes tenemos, además de la hemocianina de la sangre del caracol, la de un polímero de la tiroglobulina, estudiado por STANLEY, que tiene un peso molecular de 15 millones. Por su dimensión, coincide la primera con la de los virus de la fiebre aftosa, poliomielítico o bacteriófago, y, sin embargo, no se las considera como agente infeccioso.

Con frecuencia se han comparado los virus a los enzimas; por regla general el peso molecular de los enzimas es más pequeño que el de las proteínas-virus. Modernamente se han estudiado fer-

mentos de mayor peso molecular. Según SURMERS, GRALEN y ERIKRONI-QUEUSEL, el peso molecular de la ureasa (473.000) es del orden del del virus de la poliomielitis y más pequeños que el bacteriófago del estafilococo; sería un punto de unión entre enzimas y virus.

Es difícil prever el desarrollo y fin de la idea proteína-virus de STANLEY. Si se mantiene que todos los virus son proteínas de alto peso molecular, entonces podemos decir, con DOERR, que el problema se ha desplazado a otros carriles.

Si el corpúsculo elemental vírico es una molécula y no un elemento vivo de tipo celular, es fácil imaginar que existan en las células espacios en los que, por pequeños que sean, puedan alojarse en ellos las moléculas víricas.

No es fácil comprender por qué esta molécula libre se comporta como los microbios infecciosos. Para aclarar esta cuestión existen dos hipótesis: 1.<sup>a</sup> Que las proteínas-virus, en dispersión molecular, no se multiplican autónomamente (esto es, de sí mismas), sino que son producidas por la célula huésped infectada. 2.<sup>a</sup> Aceptando la idea de la "molécula viva", que al fin y al cabo es la sustentada por BIGERINCK al formular en el siglo pasado el *contagium vivum fluidum*.

Ya hemos dicho la tendencia actual, que queremos subrayar, de considerar a los virus moleculares como partículas desprovistas de vida.

### **Inactivación e inhibición de los virus.**

El virus cristalizado del mosaico del tabaco es inactivado por el  $H_2O_2$ ; formol aldehído, ácido pícrico y luz ultravioleta. En la inactivación se aprecian desviaciones del punto isoeléctrico, alteraciones de la solubilidad y del contenido del nitrógeno amínico, que indican una alteración en la molécula proteica. No se alteran ni las características serológicas (floculabilidad por antiseros específicos; capacidad antigénica) ni la forma de los cristales microscópicos.

Si tomamos como ejemplo los trabajos de ROSS y STANLEY,

vemos que el formol aldehído disminuye la actividad de la v.-p. del mosaico del tabaco en un 10-0,1 por 100; esta disminución va acompañada de la de los grupos aminos y reductores (núcleo indol-triptófano). Por la eliminación del formol aldehído por el dimetil-dehidro-resorcinol o la histidina se consigue una activación parcial — hasta doce veces más — del virus, simultáneamente con el aumento del N amino y de los grupos reductores. La actividad del virus sería una propiedad específica del virus-proteína, porque de otra manera no podría explicarse su debilitación por agentes que actúan sobre la albúmina y la reactivación posterior, aun cuando el plazo de acción del inactivador haya durado meses.

Un problema muy interesante en las investigaciones virósicas es el que plantea la conservación de cepas de virus. Por nuestra parte, hemos observado un hecho en relación con la reactivación o liberación del virus. En nuestras experiencias sobre el cultivo del virus SK de poliomiélitis en la membrana alantoidea del huevo de gallina incubado, observamos la desaparición de la virulencia al tercer o cuarto pase, al no presentar parálisis los ratones inoculados con el material de huevo. Seguimos, no obstante, la serie y a los dos pases siguientes nos convencimos que no había virus en el material que se inoculaba. Volvimos entonces al mismo material del pase tercero, que había sido negativo, y que conservábamos en helera a + 4° C. La inoculación de este material, conservado quince días a + 4° C. fué positiva. Indudablemente se había verificado durante este tiempo la liberación del virus de poliomiélitis del material al que se fijó, para realizar el parasitismo necesario a su multiplicación.

Posteriormente a esta observación se ha demostrado un hecho análogo en la fijación y elución del virus de la influenza a los hemáties de pollo. Este fenómeno lo estudiaremos más adelante, cuando tratemos de la eritroaglutinación.

Hoy día no se conoce con exactitud el mecanismo por el que se produce la inactivación de los virus. Por la variedad de factores que intervienen en la inactivación de los diferentes virus, es más lógico pensar que no se trata siempre del mismo proceso químico y que en la inactivación se pierde un complejo de factores, variable de un virus a otro. Además hay que tener en cuenta que las pruebas de

neutralización se hacen inoculando la planta o animal con el virus tratado por el inactivador, y que la falta de respuesta peculiar puede ser debida a la inactivación del virus por éste, o a su acción tóxica sobre el citoplasma de la célula huésped.

Los estudios de la inactivación de los virus por diversos agentes se completan con los que se ocupan de su inhibición. En este sentido tienen extraordinario interés las experiencias de ACKERMANN sobre el virus de la influenza, por iniciar el camino de un posible tratamiento de las enfermedades viriósicas por sustancias que interfieren en el mecanismo de producción del virus.

ACKERMANN ha demostrado recientemente que la propagación del virus de la influenza es un proceso aeróbico muy sensible a la anoxia del tejido del huésped, por las variaciones de la tensión de oxígeno o la acción de drogas inhibidoras de los enzimas del ciclo del ácido cítrico. La función del sistema enzimático del ciclo cítrico sería proporcionar la energía necesaria para la síntesis de la proteína-virus. En el metabolismo celular existen otros mecanismos productores de energía, como el de la glucólisis, pero para aprovecharla en la formación de la proteína-virus, es necesario que esté acoplado al ciclo de la síntesis de ésta. Las investigaciones de ACKERMANN se hicieron en secciones de tejidos; quedaba la duda de si los fenómenos serían los mismos en el organismo entero. El trabajo se ha realizado inactivando con fluoracetato el sistema enzimático, necesario para la oxidación del ácido cítrico, que permite, además, determinar la fase del metabolismo que se bloquea. El fluoracetato inactiva el sistema enzimático necesario para la oxidación del citrato, sin afectar a los enzimas que intervienen en su síntesis. El citrato formado se va acumulando en grandes cantidades en muchos tejidos del animal; este aumento es un índice del metabolismo de cada órgano.

Cuando se administran al ratón inoculado con V. I. dosis subletales de fluoracetato se produce en los pulmones un aumento de citrato y un bloqueo del ciclo del ácido cítrico.

**Virus - bacteria. Propiedades generales de los bacteriófagos.** *Bacteriófagos.* — No escapan las bacterias a la acción de los virus, y si ellas infectan al organismo, pueden a su vez ser infectadas por éstos. Las virosis de los microorganismos se manifiestan por la disolución o lisis. Para que sea mayor el paralelo con las virosis humanas y las de las plantas, existen también en las bacterias infecciones virósicas inaparentes, en las que no hay lisis, pero sí modificaciones de sus caracteres biológicos.

Los virus de las bacterias son los bacteriófagos; denominación dada por D'HERELLE, quien con TWORT comparten el mérito del descubrimiento.

1.º Los bacteriófagos se caracterizan por su multiplicación durante el crecimiento y lisis del cultivo de las bacterias infectadas.

2.º Por propagarse indefinidamente en serie, de cultivo a cultivo.

3.º Por no sedimentarse a la velocidad de las centrífugas ordinarias.

Existe una relación entre el número de partículas víricas y el de bacterias lisadas.

Los virus-bacterias son estrictamente específicos respecto a la bacteria sobre la que actúan. Consecuencia de esta especificidad es que la mayor parte de las bacterias receptibles al virus dan lugar a variantes resistentes al mismo, que son capaces de crecer en el cultivo, cuando han sido destruidas casi todas ellas. Las variantes resistentes son hereditariamente estables y específicas frente al virus que las provocó.

Los bacteriófagos son inactivados por las altas temperaturas, radiación y algunos venenos. Presentan propiedades antigénicas, y provocan en los animales de experimentación anticuerpos neutralizantes específicos, que sirven para su clasificación serológica.

Este carácter antigénico es propio del virus e independiente de la bacteria que lisa. Esto es, los anticuerpos antibacterianos no neutralizan a los fagos, ni las bacterias absorben, del suero antivírico, los anticuerpos neutralizantes del virus.

*Clasificación.* — Los bacteriófagos presentan una gran variedad

de tipos que pueden diferenciarse serológicamente o analizando la especificidad del huésped. Existen dos procedimientos para establecer las relaciones sistemáticas entre los virus, a saber: el que estudia la evolución experimental de los sueros tipos, y el que compara las propiedades de los tipos ya conocidos.

El primer procedimiento es el mejor, pero el segundo es más sencillo. Generalmente es aprovechar para el estudio un grupo de fagos conocido como sistema T. El núcleo del grupo consta de siete tipos, denominados T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, ..., T<sub>7</sub>, descritos y seleccionados por DEMEREC y FANO (1945). Todos los tipos tienen la propiedad de infectar la cepa B de *Escherichia coli*.

El dato más significativo es el tamaño del aclaramiento del cultivo de la bacteria en agar. Los tipos T<sub>1</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>7</sub> lo hacen formando grandes manchas, mientras que el T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub> lo hacen en pequeñas.

### **Morfología y tamaño de los fagos.**

La observación con el hipermicroscopio de los fagos nos ha proporcionado la gran sorpresa de demostrar su gran complejidad al proporcionarnos nuevos datos.

Este estudio, iniciado por RUSCKA (1941), LURIA y ANDERSON (1942), demuestra una imagen diferente y característica para cada uno de ellos. Las partículas víricas están adsorbidas a la bacteria receptible. El número de partículas visibles en el lisado es aproximadamente el mismo que el título obtenido por el contado de placas. El estudio del grupo T demuestra que los virus T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>6</sub> son los más grandes y morfológicamente idénticos. Presentan cuerpo oval de 65-80 m $\mu$ , un tallo recto de unas 20  $\times$  120 m $\mu$ , y una estructura interna diferenciada. El T<sub>5</sub> es tan grande como los anteriores; su cuerpo es esférico. El T<sub>1</sub> es parecido al anterior, pero más pequeño, con un diámetro aproximadamente de 50 m $\mu$ . Los más pequeños son el T<sub>3</sub> y el T<sub>7</sub>, con un corpúsculo esférico de un diámetro aproximadamente de 30 m $\mu$ .

Los fagos más pequeños tienen un diámetro de 10-20 m $\mu$ . Es evidente que los bacteriófagos forman un grupo muy heterogéneo de

agentes infecciosos. Se plantea el problema de determinar si representa o no algo más que una clase biológica.

El método corriente de estudiar el crecimiento de los fagos consiste en mezclar cantidades adecuadas de bacterias y virus, de tal manera que se sepa el número de bacterias que se reproducen y son infectados por un número conocido de partículas de virus. Pocos minutos después de hecha la mezcla se espera a que se produzca la lisis de la bacteria infectada; una vez conseguida, se diluye una parte en caldo para probar las bacterias infectadas por el virus.

Del cultivo diluído se toma una muestra, en la que se titula el contenido en virus, y con los datos obtenidos se elabora una curva de crecimiento.

Hay que advertir que esta curva no expresa la multiplicación del virus, como ocurre con las bacterias, sino la liberación de virus, de las células lisadas por él. El crecimiento de los virus puede determinarse, o por el período de latencia, esto es, el período de tiempo que transcurre entre el momento de la fijación del virus a la bacteria y su liberación, o por el rendimiento de virus por bacteria infectada (DELBRUCK, 1946).

La determinación del período de latencia, en condiciones determinadas, nos proporciona datos característicos del virus, aprovechables en la taxonomía.

La cantidad de virus obtenida de cada bacteria suele ser de 120 a 400 por cada una de ellas. Las diferencias que se encuentran entre los virus estudiados no constituyen peculiaridades de los mismos. Es notable la velocidad con que crecen. Se han observado crecimientos de 300 veces en 13', que corresponde a 1,5' por generación, si se considera que el virus crece geoméricamente, ó 2,6" si el crecimiento es lineal. Por regla general el crecimiento del virus está íntimamente ligado al de la bacteria huésped.

La inhibición del crecimiento de la bacteria, por la acción de sulfamidas o por 5-metil-triptófano, repercute también sobre el crecimiento del virus, que puede incluso cesar.

En general existe una correlación entre el crecimiento de las bacterias y los virus. A veces se rompe esta correlación y entonces vemos una disminución de la velocidad de crecimiento de la bacte-



ria sin que varíe el período de latencia del virus. Esto sucede, por ejemplo, con la *E. coli* B y los virus que la lisan cuando se cultiva aquélla en medio con pH 3 o con lactato amónico. Esta distinción del crecimiento de bacteria y virus puede apreciarse también cuando varía el pH de los cultivos. NORRHOP (1939) observó que a pesar de que el pH 5,6 era bacteriostático para el *B. megatherium*, permitía, sin embargo, un gran rendimiento de virus.

El precisar las relaciones del crecimiento entre bacteria y virus, ha hecho posible el estudio de la influencia de simples metabolitos en sus crecimientos.

Los trabajos realizados en esta dirección demuestran que el crecimiento de los virus exige el suministro a las bacterias de nitrógeno, fósforo y carbono oxidable, que por otra parte son indispensables para el crecimiento de éstas.

Estos resultados hablan a favor del origen endógeno de los virus por medio de reacciones antibacterianas, que requieren poca energía para que se realicen (KRUEGER y SGRUEPER, 1939). Los virus se originarían de "precursores" que se encontrarían en las células por reacciones que requieren poca energía. Si se admite que estos precursores de los virus existen en las células, hay que creer que la cantidad de ellos debe ser muy pequeña.

El empleo de los isótopos como trazadores, ha demostrado que el fósforo radioactivo lo toma el virus del medio externo, y no del que asimilan las células antes de la infección.

Existen además dos orientaciones de trabajo para identificar los asimiladores específicos del crecimiento de los virus: una, genética; otra, bioquímica. Por la primera se buscan mutantes de bacterias que adsorben el virus, pero no los liberan (HENRY y HENRY, 1946). La bioquímica emplea sustancias que no inhiben el crecimiento de las bacterias, pero sí el del virus. Un buen ejemplo lo tenemos en los derivados de la "acridina", que a determinadas concentraciones no impide el crecimiento de la bacteria, pero sí el del virus T<sub>2</sub>. El bloqueo del crecimiento del virus es posterior al período de latencia, y probablemente más por inhibición del crecimiento del virus que por modificar alguna fase de la lisis de la bacteria.

**Mecanismo de fijación de los virus a las células.** Uno de los puntos más difíciles y menos conocido de la acción de los virus sobre las bacterias, es lo que se refiere al mecanismo íntimo de la reacción por el que una unidad de virus se fija a la bacteria o célula huésped para iniciar el ciclo metabólico invasor. Aquí también nos proporciona el parasitismo de la *E. coli* B por el bacteriófago, un excelente material de investigación por ser posibles, por medidas precisas de las fases del sistema, determinar cuantitativamente las interacciones virus-bacteria. La adsorción de la partícula del fago por la bacteria es directamente proporcional a las concentraciones de ambos. Para algunos virus la reacción en caldo a 37° C. es muy rápida y permite una amplia fijación del virus a la bacteria. Esta fijación es altamente específica, como lo demuestra el que formas mutantes de bacterias receptibles no son lisadas por el virus, al que antes eran receptibles, a pesar de serlo por otras cepas de virus que parasitan a la bacteria original e incluso por algunas mutantes derivadas de ella.

Los factores que intervienen en la adsorción del virus por las bacterias, pueden ser inorgánicos y orgánicos; entre los primeros, el  $\text{Na}^+$  acelera la adsorción de los fagos; entre los segundos, el 1-triptófano es un cofactor indispensable para que se realice la fijación del fago a la bacteria.

Muy recientemente se ha demostrado que la unión inicial del virus con la bacteria es de naturaleza electrostática y está determinada por una distribución apropiada de cargas iónicas en las superficies del virus y de la bacteria (PUCK, GAREN y CLINE, 1951). La rapidez de la reacción entre ambos, en las condiciones óptimas, hace suponer que su unión inicial es debida a la existencia de una fuerza de atracción electrostática. Una vez realizada la combinación virus-bacteria, comenzarían las reacciones enzimáticas.

La regulación de la constitución iónica del medio permite controlar las reacciones entre los virus y sus bacterias huéspedes, cuando tienen lugar en medios químicamente bien definidos, desde cero al máximo teórico. El  $\text{Mg}^{++}$  activa una mezcla inerte de virus y bacteria. El efecto que se consigue es completo e instantáneo, por ser

muy rápida la fijación del virus y acortarse el tiempo en que se alcanza la mayor actividad, por la adición de los iones necesarios.

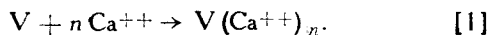
También se consigue una activación análoga a la del  $Mg^{++}$  con un grupo de iones positivos. Las sales de  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ba^{++}$  y  $Mn^{++}$  producen una reacción completa y rápida a concentraciones de  $5 \times 10^{-4}$  Mc. Las concentraciones mayores o menores que ésta disminuyen la velocidad de fijación. Con las sales de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Li^+$  se consigue el mismo efecto a la mitad de velocidad y a concentraciones 10 veces mayores.

Los cationes trivalentes  $Al^{+++}$ ,  $Cr^{+++}$ ,  $Fe^{+++}$  inactivan permanentemente el virus.

La influencia de la reacción por los cationes es debida más que a la interacción de fuerzas químicas específicas a una distribución de gran cantidad de cargas. Los cationes actúan más por la carga iónica total que por su naturaleza.

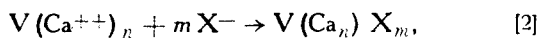
Estos hechos no se explicarían si la reacción fuese debida a un cambio de covalencias; por el contrario, se comprende fácilmente en términos de un mecanismo electrostático.

El mismo mecanismo tiene lugar en la fijación del virus a substratos inorgánicos; el virus puede eluirse de ellos de la misma manera que de las bacterias huésped a las que se ha fijado. Para que la elución tenga lugar, basta cambiar la dirección del equilibrio de la reacción. La acción del virus sobre la bacteria tendría lugar en dos fases; en la primera se fijaría el virus inactivo al catión para dar lugar a un virus activo, según la reacción siguiente:



Por esta reacción los cationes se unen a los puntos de fijación de primera clase de la superficie del virus, dándole una configuración iónica que corresponde exactamente a la de la célula huésped.

En la segunda fase la fijación se realizaría por la unión del catión del virus activado, con las cargas negativas distribuídas sobre la superficie de la bacteria, según la siguiente reacción:



en la que  $mX^-$  representa las cargas negativas distribuídas sobre la

superficie de la bacteria. Para el virus T<sub>1</sub> y la *E. coli* B, el complemento geométrico electrostático se realiza en un medio que contiene  $5 \times 10^{-4}$  M CaCl<sub>2</sub>. En estas condiciones, el equilibrio de la reacción [1] se desplaza hacia la derecha, así que todas las partículas del virus están en forma activa. La enorme rapidez de la reacción en estas condiciones es debida a que la doble descomposición iónica, en las dos reacciones, favorece en alto grado la máxima colisión eficiente. Cuando la concentración de Mg<sup>++</sup> ó Ca<sup>++</sup> es menor, la desviación a la derecha no es tan acusada, y al disminuir la concentración de V(Ca<sup>++</sup>)<sub>n</sub> lo hace también la fijación del virus a la bacteria (PUCK).

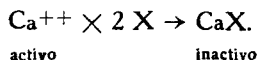
La activación de la reacción por la unión de los cationes a los puntos de fijación de primera clase implica la existencia de puntos específicos en la superficie bacteriana y en la del virus. El papel del virus se ha estudiado aquí por la capacidad que tienen los bacteriófagos de reaccionar con el catión metálico a estas mismas concentraciones, lo que hace suponer existan también en el virus puntos de fijación de primera clase. En el agua destilada el fago T-1 reacciona con el ion Ca<sup>++</sup> a las concentraciones  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M.

ADAMS encuentra que los iones divalentes Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, a la concentración de  $10^{-3}$  M, protegen al T-1 de la descomposición espontánea en disolución acuosa, no haciéndolo a concentraciones más bajas que  $10^{-4}$  M. Es importante el descubrimiento de ADAMS que para que los cationes monovalentes produzcan los mismos efectos que los iones divalentes, en la fijación del T-1 a las bacterias, es necesario emplearlos a concentraciones mucho mayores. La necesidad de utilizar concentraciones más altas de iones monovalentes para obtener alguna fijación, es un indicio de la débil unión de estos iones a los grupos de fijación del virus.

Confirma la hipótesis expuesta los resultados obtenidos en el estudio de la fijación del virus a filtros de vidrio. La concentración óptima de T-1 para su fijación en éstos es de  $10^{-3}$  M Ca<sup>++</sup> ó  $10^{-2}$  M Na<sup>+</sup>. Hay además un dato interesante que señalar en las experiencias de fijación a los filtros de vidrio, y es que en éstos no se produce la fijación del virus en un exceso de Ca<sup>++</sup>.

Es probable que la inhibición de la fijación del virus por exce-

so de  $\text{Ca}^{++}$  sea debida al bloqueo de los sitios de fijación celular, fenómenos que no ocurren en el sistema vidrio. Según esto, la reacción tendría lugar de la siguiente manera:



La fuerza de unión en esta reacción es menor que la del  $\text{Ca}^{++}$  con el virus. La inhibición solamente se inicia a partir de concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ , mayores que  $5 \times 10^{-3}$  M. La activación máxima por el  $\text{Ca}^{++}$  tiene lugar cuando la concentración es una décima de la citada. Los iones monovalentes necesitan concentraciones todavía más altas para competir eficazmente con el virus activado en la unión a los sitios de fijación X de la célula.

El experimento hecho con radioisótopos como trazadores ha demostrado que es posible inhibir la invasión del virus bloqueando los puntos de fijación celular con exceso de catión. Es importante señalar que la cantidad de virus fijado a la célula en presencia de  $\text{Na}^+$  es menor que la fijada a concentraciones óptimas de  $\text{Ca}^{++}$  ó  $\text{Mg}^{++}$ ; esto indica que los iones monovalentes inician su fijación a los puntos de unión de "segunda clase" antes de que hayan sido saturados todos los de "primera clase"; esto es, los iones monovalentes actuarían sobre la bacteria neutralizando las cargas antes de que se hubiese activado el mayor número posible de partículas de virus.

De todo lo expuesto se deduce que podemos considerar al virus como una molécula en la que están distribuidos por su superficie agrupaciones específicas que son capaces de unirse reversiblemente con los iones de la solución. El número de iones, de cualquier clase, que se fijan en un momento dado con el virus es una función de la energía de unión de los distintos puntos en que es posible esta fijación y de la concentración de estos iones en el medio.

La especificidad de los virus para las diferentes células huéspedes dependería de la distribución geométrica en su superficie de los puntos de unión con los iones y de la energía de unión de estos sitios con los iones específicos.

Cuando se mezclan varios virus en el mismo medio se establece en su superficie diferentes configuraciones electrostáticas que deter-

minan su capacidad para fijarse a una determinada bacteria. Por ahora se ha estudiado con detenimiento el papel que juegan ciertos cationes en la reacción. No obstante, hay datos suficientes para sospechar que también los iones participan activamente en ella.

El valor de esta interpretación general que acabamos de exponer no lo aminora la existencia de cepas de virus que necesitan la presencia de un cofactor orgánico, del tipo del L-triptófano, para que tenga lugar la fijación del virus a la bacteria. Es probable que la acción de estas moléculas consista en facilitar la fijación de los iones a los puntos adecuados. El triptófano pierde su función cofactora si se eliminan sus grupos de unión, representados por el grupo alfa-amino o el carboxilo. El indol inhibe la acción del triptófano en esta reacción; contiene el mismo anillo aromático condensado que el cofactor normal, pero le faltan las cadenas laterales, altamente polares, a las que se unen fuertemente los iones. Probablemente la fijación inicial del triptófano al virus tendría lugar por medio de los elementos estructurales del anillo, que son comunes al triptófano y al indol. En el caso del primero la estructura que resulta de la unión de un cierto número de iones a su grupo amino y carboxilo tendría la configuración adecuada para que se verifique a continuación la fijación a las células huéspedes. Por el contrario, en el indol la estructura que resulta de la unión con los iones no es la conveniente para esta segunda fijación.

Esta teoría exige que los virus que han mutado deficientemente necesiten, cuando está en presencia de un exceso de triptófano, determinadas características salinas, antes que se verifique la fijación a las bacterias; hecho confirmado por PUCK y sus colaboradores.

También se han descrito fenómenos análogos a los anteriormente dichos en los virus de los animales.

DAVENPORT y HORSFALL han observado recientemente que las soluciones que contienen bajas concentraciones de electrólitos inhiben la fijación de los virus de la neumonía del ratón y de la influenza a los eritrocitos y a las partículas de pulmón. En estas soluciones el primero de estos virus se redisociaría de las partículas del pulmón que lo habían adsorbido, pero se retarda la elución del de la influenza.

En realidad la elución del virus de la influenza A está en relación con la concentración salina de la disolución.

Los autores anteriormente citados interpretan estos hechos suponiendo que la fijación del virus de la neumonía del ratón a las células sería debida a la formación de un complejo lábil análogo a una sal débil.

Para el virus de la influenza el mecanismo de fijación sería diferente, al menos parcialmente, por ser distinto su comportamiento en la elución. La diferencia del comportamiento entre estos dos virus sería debida a la distinta naturaleza de la reacción electrostática. La elución por concentraciones salinas altas ocurre siempre que la fijación e invasión del virus es debida a mecanismos análogos a los que intervienen el cloruro de calcio y cuando es posible la fijación de los iones de la disolución a los puntos de fijación de segunda clase.

Si se acepta en el sistema virus-bacteria la existencia de dos clases de puntos de fijación a los que pueden unirse los cationes, tendremos que admitir que es posible haya cationes específicos capaces de inhibir la invasión por el virus, por tener una energía de unión para los puntos de "segunda clase" mayor que la de los que promueven la invasión. Estos iones actuarían como competidores antagónicos de los iones que normalmente favorecen la fijación; es el caso del  $Zn^{++}$ . Este ion bloquea específicamente la segunda fase de la reacción de naturaleza enzimática en la lisis de la *E. coli* B por el virus T-1, al favorecer la fijación del fago a las células del *E. coli* B, lo mismo que lo hacen los iones  $Ca^{++}$  ó  $Mg^{++}$ ; pero con una diferencia: que la reacción no prospera, cesa, y queda en la fase primera reversible. Esta interrupción de las fases por el  $Zn^{++}$  también es efectiva cuando se realiza la fijación por los iones  $Ca^{++}$  ó  $Mg^{++}$ . La presencia de  $Zn^{++}$  protege a las células contra la destrucción. El virus puede fijarse a la parte externa de la célula, pero no intervenir en el metabolismo celular.

Los experimentos con el isótopo radioactivo  $Zn^{65}$  demuestran que para que éste bloquee la segunda fase de la reacción es necesario que la célula de *E. coli* B fija  $4 \times 10^7$  átomos de Zn.

También actuarían sobre la segunda fase de la reacción las radiaciones ultravioleta.

La acción del triptófano como cofactor de la mutante del fago T-4 es sobre la primera fase de la reacción, favoreciendo la fijación del virus a la bacteria.

Las interpretaciones teóricas de las observaciones expuestas recuerdan el mecanismo de la acción catalizadora del metal en la unión enzima-substrato, estudiada de modo especial por SMITH, con la dipeptidasa. La mayor diferencia entre los dos sistemas consiste en que la activación por metales del sistema virus-célula huésped es una reacción extraordinariamente rápida, en tanto que la del sistema péctido-peptidasa es lenta. Esta diferencia puede ser debida a que en el primer sistema predominan las interacciones iónicas, y en el segundo, la coordinación de fuerzas.

El mecanismo propuesto por PUCK para explicar la especificidad y primeras fases de la interacción virus-célula es diferente de la explicación fisicoquímica utilizada, con éxito, para interpretar la especificidad biológica de la reacción antígeno-anticuerpo.

La gran velocidad de reacción en el sistema virus-bacteria no puede explicarse por la acción de fuerzas de unión muy débiles, como las de VAN DER WAAL, porque la acción de fuerzas muy débiles serviría para explicar las reacciones en modelos que tienen un alto grado de especificidad, y en las que la atenuación por la distancia está compensada por la más exacta correspondencia geométrica entre sus dos superficies, que facilita, en grado mayor y suficiente, los contactos atómicos necesarios para que se formen uniones estables. Esta estricta adaptación estéreo-métrica exige que sólo se efectúe un pequeño número de colisiones casuales.

Para evitar esta dificultad, ANDERSON ha propuesto la existencia en el virus y célula huésped de pequeños "elementos específicos proyectantes" que pueden dar lugar a una reacción rápida y específica.

Por ahora no hay dato experimental alguno que abogue en favor de la existencia de esta estructura. En las uniones de carácter iónico la especificidad virus-huésped está controlada por la relación de fuerzas electrostáticas que dan lugar a la fijación de pequeños



iones a los puntos específicos de ambas superficies. Una alta colisión estaría facilitada, primero, porque las fuertes fuerzas electrostáticas orientarían las dos configuraciones complementarias durante un período de aproximación en el curso de una colisión; segundo, porque aunque en la primera colisión intervenga sólo una fracción del número máximo de grupos capaces de reaccionar de las dos superficies, las fuerzas de unión son lo bastante fuertes para mantener los cuerpos uno junto a otro el tiempo suficiente para que se realice un ajuste más favorable de las estructuras iónicas de las superficies.

**Variaciones y mutación de los virus.** A las formas que se separan del virus original, algunas no infecciosas, se consideran como mutaciones. Se aprecian por las modificaciones de los síntomas producidos en el huésped como consecuencia de las acciones de la virulencia, que con frecuencia consisten en un aumento de la misma. Las variaciones de los virus han sido atribuidas a la situación en un medio no habitual. Es probable que los virus varíen constante y espontáneamente al azar, y que los tratamientos a los que se atribuye el cambio de las características del virus actúen, más que por modificar la estructura de una determinada partícula, por variar la producción de las diferentes categorías de éstas. El cambio de la virulencia, por ejemplo, se mantiene en pases sucesivos, y de aquí que se considere razonable la denominación de mutación, por tratarse de un cambio permanente y hereditario; por otro lado, los tratamientos para provocarla no hacen otra cosa que seleccionar una mutante preexistente. La tendencia a producir variantes con propiedades patógenas diferentes puede ser debida a la constitución química y al comportamiento físico. Es posible que los virus cuyas partículas se aglutinan no estén expuestos intrínsecamente a cambiar, pero su poder de combinación con las otras proporcionaría la posibilidad de reconstruir unidades que no ocurre con los virus, cuyas partículas permanecen independientes. Según éstos, los cambios que se consideran como mutaciones no serían debidos a la formación de un nuevo grupo,

sino simplemente a la combinación de grupos preexistentes antes separados.

Los virus se comparan y asemejan a los genes porque muchos de los efectos que producen en las plantas son análogos a las de éstos. La comparación no es buena, porque sabemos con certeza que las cepas de un virus pueden diferir unas de otras por varios caracteres y que cada diferencia puede transmitirse independientemente de las demás. Por ejemplo, la cepa del virus del mosaico del tabaco que produce la bigarrue amarilla del tabaco es poco patógena y, sin embargo, para que produzca efecto es necesario emplearla a concentraciones bajas. Parece, pues, que las partículas de virus son portadoras de diversos factores hereditarios, cada uno de los cuales puede considerarse legítimamente como el equivalente de un solo gene, por poder variar mientras los otros permanecen constantes.

Las variaciones de los virus afectan principalmente a la virulencia, transmisión por insectos, punto isoeléctrico, tipo cristalino, constitución antigénica y contenido en ácidos aminados.

No han arrojado ninguna luz sobre la naturaleza de los grupos activos de los virus las tentativas hechas para producir mutaciones y cambios químicos de las partículas del virus.

Es posible modificar por tratamientos químicos la virulencia de un virus frente a determinado huésped.

Otra orientación de trabajo para determinar las diferencias de las cepas de virus es el estudio de las propiedades y composición química. Los valores en diversos ácidos aminados del virus del mosaico del tabaco han experimentado una serie de modificaciones en el curso de los años. De las investigaciones últimas parece estar bien establecido que algunos ácidos aminados varían en sus proporciones en las distintas cepas naturales; existen diferencias notables entre los ácidos aminados que entran a formar parte de los virus. Es muy probable que puedan ocurrir cambios importantes de la estructura química sin que se modifique aparentemente la virulencia de las partículas.

Como ocurre con frecuencia en la interpretación de los fenómenos biológicos, se ha exagerado también aquí la importancia de la presencia o ausencia de determinados ácidos aminados en uno u

otro virus. STANLEY, discutiendo la constitución del virus del mosaico del tabaco y de la cepa Rib-Grasas, afirma que la diferencia "demuestra de manera perentoria que la mutación de un virus puede estar acompañada de la introducción de varios centenares de moléculas de histidina en su estructura". Como indica muy bien BAWDEN, esto podría aceptarse si la cepa Rib-Grass fuese una mutación de la del virus del mosaico del tabaco; pero no es prudente hacerlo cuando los orígenes de los dos virus son distintos y todavía desconocidos.

Las pruebas inmunológicas demuestran las diferencias antigénicas de ambos virus.

STANLEY afirma que los análisis de los ácidos aminados nos proporcionan datos claros sobre el tipo de cambio de la estructura química que tiene lugar en la mutación de un virus.

En el estudio de los fagos llama la atención la gran especificidad entre la bacteria y el bacteriófago que la lisa. Se ha analogado el fenómeno de adsorción del fago por la bacteria al que tiene lugar entre antígenos y anticuerpo.

La especificidad de la reacción virus-bacteria es notable en las mutantes de una cepa de bacteria receptible, que, por otra parte, son resistentes a uno o más virus. Veamos un ejemplo: Si en una placa de agar se siembra una mezcla de bacteria de la cepa B de *Scherichia coli* a una concentración de  $10^8$  con un exceso de virus  $T_1$ , veremos cómo son lisadas la mayor parte de las bacterias, no todas. Estas bacterias que sobreviven son mutantes resistentes capaces de crecer en medios con virus  $T_1$ . Aparecen en la misma proporción en todos los cultivos de la bacteria receptible (LURIA y DELBRUCK, 1943).

Estos mutantes resistentes son de varias clases. Se han llegado a distinguir seis u ocho mutaciones resistentes al  $T_1$ , producidas a partir de cepas puras de B. La mutante B-1,5, por ejemplo, es resistente a los virus  $T_1$  y  $T_5$ , a pesar de no existir diferencias de cultivo o serológicas de la cepa original B. La mutante B-1 forma colonias pequeñas y es resistente sólo al  $T_1$ ; además, necesita para su desarrollo triptófano y nitrógeno amínico (ANDERSON, 1944). Algunos mutantes de esta clase no necesitan triptófano.

Es interesante señalar las diferencias en el tamaño de las di-

versas cepas y, sobre todo, el hecho notable de que algunas de ellas varíen de nuevo a formas receptibles al  $T_1$ .

Indudablemente que la receptividad o resistencia al virus  $T_1$  está determinada por diferentes factores genéticos de la bacteria.

La necesidad de triptófano, señalada anteriormente como requisito de algunas cepas B-1, hace pensar que existe alguna relación metabólica entre la capacidad de las bacterias para sintetizar triptófano y la de formar el componente de la superficie celular necesario para la adsorción del  $T_1$  (ANDERSON, 1944).

Otra interpretación es la que hace depender la unión del virus a la bacteria de alguna peculiaridad accidental del aparato genético de la célula, de modo análogo a lo que sucede al enlace genético entre el sexo y la hemofilia en el hombre (STURTEVANT y BEALLE, 1939). Es posible que la fijación del virus a la bacteria se haga por estos dos mecanismos. Las bacterias pueden presentar formas de resistencia a varios virus que entre sí no tienen relación morfológica o antigénica; esto sucede, por ejemplo, con las parejas de virus  $T_1 T_5$  y  $T_3 T_4$ .

Por otra parte, es raro encontrar formas de resistencia para uno o más virus del mismo grupo, aunque éstos estén íntimamente relacionados, como sucede con el  $T_2$ ,  $T_4$  y  $T_6$  (HERSHEY, 1946). También existen mutaciones de los virus, y así vemos cómo un mutante de  $T_1$  (LURIA, 1945) es capaz de lisar bacterias resistentes al  $T_1$  y poseer además un grado de actividad idéntico que el  $T_5$ .

Todos estos hechos sirven para explicar una regla general, a saber: La mutación, que supone un ligero cambio en la estructura del virus, puede proporcionarle una nueva especificidad hacia el huésped y separarle del grupo a que pertenecen, para relacionarlo, por lo menos aparentemente, con otros virus de diferente origen.

Recientemente se han realizado estudios sobre las variaciones de las bacterias y fagos, en los que se demuestran que cuando se mezclan dos cepas bien definidas por dos o más caracteres peculiares a cada una de ellas, se obtiene cierta proporción de cepas mixtas o "recombinadas". Si dos cuerpos caracterizados por las propiedades AB y CD, respectivamente, se mezclan y en el cultivo se obtienen cepas con caracteres AD o BC, es lógico admitir que

ha tenido lugar una recombinación, siempre que las cepas cultivadas solas no den lugar a recombinados.

Para esta clase de experimentos es necesario disponer de cepas puras y distintas de virus, diferenciables unas de otras, ya sea por la capacidad para aglutinar hematíes de diferentes especies animales o por la función enzimática de los virus frente a mucoides solubles o celulares; peculiaridades que reflejan la actividad de un gran número de partículas de virus.

En sus trabajos sobre la transformación del virus de influenza A en O, BURNET y colaboradores encontraron repetidas veces que esta última forma puede mantenerse en pases seriados cuando se hacen las inoculaciones con diluciones infectivas límite o próximas a ellas. Este hecho, no comprobado, por otra parte, en ningún otro laboratorio, proporciona la demostración de que la variación de la fase O a la D es un proceso equivalente a una gran mutación con predominio selectivo, por mayor crecimiento, de la forma mutada y no un efecto del nuevo medio sobre el virus.

La mutación para BURNET de la cepa A a la B puede explicarse de dos maneras: una, porque la reproducción repetida en un nuevo medio intracelular modifica progresivamente la calidad de las partículas del virus hasta adquirir los caracteres de la cepa B. Otra, porque entre las mutantes, que constantemente se producen de la cepa original, hay algunas que al adaptarse mejor al nuevo ambiente proliferan más cuantiosamente y prestan al material vírico alantoideo, del que se obtienen, las características de la fase B.

La mutación se reconoce con una frecuencia del orden de  $10^6$ . La forma original se multiplica mucho más rápidamente que las demás y no da lugar al predominio de la mutante cuando se hace la inoculación de una partícula de virus y se practica la recolección a las cuarenta y cuatro horas. En este caso, la mayor parte de las partículas del líquido alantoideo son del tipo original.

La pureza de la cepa se mantiene si se siguen los pases con diluciones del orden  $10^{-8}$ , por inocularse sólo de una a cinco partículas de virus original. Por el contrario, si los pases se hacen con virus diluido al 1 por 100 se observa una variación de los caracteres, por inyectarse, además de las partículas del virus tipo original, una can-

tividad bastante grande de formas mutantes, que, al multiplicarse más rápidamente, predominarán sobre ellas.

La obtención de variaciones de un virus por el método de las diluciones es un buen procedimiento para estudiar la influencia del ambiente intracelular sobre el virus, al producirse aquéllas por la acción de ésta.

El medio influye también sobre el tipo de variación o mutante que se forma. Bastan pequeñas diferencias en los embriones de pollo para que prevalezca la formación de una determinada mutante sobre las demás.

Análogamente a lo que sucede con las bacterias, podemos admitir que en la multiplicación de los virus se desarrollen también cierto número de formas mutantes que al multiplicarse en los pases sucesivos aumentan extraordinariamente y llegan a sobrepasar e incluso reemplazar a la forma original.

Un procedimiento para obtener estas cepas es el de diluir el material de inoculación hasta que la infección sea sólo de un pequeño número de animales o inocular especies muy receptibles, con objeto de que la infección se inicie por una sola unidad de virus.

Cuando las formas mutadas están en pequeña cantidad, entonces es conveniente pasar la cepa por células huésped en las que la mutante se multiplique más favorablemente que al virus predominante, y una vez conseguido el predominio de aquéllas sobre éste, aislar la forma mutante por el empleo de diluciones crecientes. Otro procedimiento es el hacer uso de agentes físicos, químicos o biológicos para los que la forma mutada es más resistente que la original.

Los fenómenos de recombinación señalados plantean el problema de si la división del virus de la influenza es por fisión binaria o por otro mecanismo. En favor de la primera hipótesis tenemos el que en ciertas condiciones dos partículas de virus pueden dar lugar a un tipo primitivo de unión sexual, con redistribución de los caracteres en la forma haploide, análogamente a lo que sucede en la recombinación bacteriana con la *E. coli* cepa K 12 (TATUMLEDERBERG, 1947).

También es posible que una cepa adaptada a crecer en un medio intracelular, cerebro por ejemplo, puede facilitar la transformación rápida de otro virus en una forma capaz de hacerlo en medio

desusado. Este fenómeno es análogo, en cierta manera, al del simbiosis de las bacterias, que consiste en que dos variantes de bacterias incapaces de sintetizar dos metabolitos esenciales pueden cultivarse mezcladas en un medio en el que solas no lo harían.

La división del grupo de los colifagos T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>6</sub> tendría lugar porque las partículas de virus se romperían en 30-50 subunidades (genes) al penetrar en la superficie de la bacteria. Estas partículas más pequeñas se dividirían independientemente, y hacia el final de la fase del desarrollo intracelular se reconstruirían de ellas las partículas infecciosas de virus que se liberan en la lisis de la bacteria.

La viabilidad de esta interpretación está basada en los estudios de LURIA (1947) sobre la infecciosidad de los virus tratados con luz ultravioleta, en los que se aprecia que mientras una partícula de virus no es infecciosa, una alta proporción de ellas dan lugar a la multiplicación y lisis. Abogan, además, en favor de esta opinión las recombinaciones que tienen lugar en el colifago T. (HERSBEY y ROTMAN, 1948, y DEBRUCK y BAYLEY, 1946).

Estas consideraciones hechas acerca de los virus de las bacterias son adaptables también a los virus animales.

HOYLE (1948) ha comprobado la desaparición del virus de la influenza pocas horas después de la infección de la alantoides. Por nuestra parte, hemos demostrado que el cultivo de la cepa SK de poliomiélitis en membrana alantoidea, pierde a veces su infecciosidad inmediata, para reaparecer a los catorce o quince días de permanecer el material de inoculación en helera a + 4° C.

BAUER (1949) sugirió ya que la multiplicación de los virus animales tendría lugar según el mecanismo expuesto. HOYLE cree que la desaparición de virus demostrable en la membrana alantoidea es debida a la desintegración de las partículas infecciosas en otras no infecciosas. La existencia de esta forma puede demostrarse por la presencia en los tejidos de antígenos solubles que fijan el complemento antes de que aparezcan la infecciosidad y hemoaglutinación del virus.

Han confirmado también la desaparición temporal del virus: HENLE y HENLE (1949) e ISAACS y EDNEY (1951).

BURNET no acepta que el virus se desintegre en una fase solu-

ble compuesta de partículas uniformes. Para el investigador australiano las unidades producidas serían unidades genéticas individuales correspondientes al tipo, en tanto que las unidades equivalentes de cepas de virus relacionados pero distintas, serían alelomórficas recíprocas.

Cree que esta interpretación es más lógica que la de que el virus se desintegre en una fase soluble compuesta de partículas enfermas.

En las combinaciones de virus es más importante el tipo serológico de los recombinados que cualquier otro carácter.

Los trabajos de genética que se realizan con el virus de la influenza, tienen el inconveniente de no haberse podido aislar una célula infectada por las dos cepas; esto es, con infección cruzada. El único procedimiento que tenemos, por ahora, es el hacer las inoculaciones con concentraciones altas, para dar lugar a que puedan multiplicarse las formas normales y las mutantes, y una vez conseguida esta multiplicación inhibir el crecimiento de las originales para que prosperen, lo más posible, las recombinadas. Para esto es necesario poder diferenciar serológicamente las cepas de los virus que se inoculan para, una vez identificadas, inhibir la cepa con los anticuerpos específicos y dejar en libertad las otras formas.

La existencia de formas filamentosas del virus descritas recientemente (CHU, DAWSON y ELFORD, 1949), hacen suponer que sus partículas se forman de una mezcla de unidades más pequeñas que se automultiplican. De esta manera se explicaría la producción de unidades infecciosas esféricas a partir de filamentosas.

Basado en todos estos argumentos, BURNET, que ha dedicado estudios muy detenidos a las variaciones del virus de la influenza, admite que las partículas del virus de la influenza son compuestas y se rompen al penetrar en las células en unidades más pequeñas, que se dividen separadamente y dan lugar a una mezcla de material vírico, de la que pueden reconstruirse las unidades infecciosas. El mismo señala que es una hipótesis todavía no demostrada.



**Inmunidad.** El empleo de las reacciones serológicas para caracterizar los virus, comprobando en el suero de los enfermos la presencia de sustancias inmunes, ha contribuído notablemente a su mejor conocimiento.

Al principio, el no disponer de la cantidad de antígeno necesaria para practicar las reacciones, dificultaba notablemente su aplicación. Los progresos realizados en el cultivo de los virus, entre los que merece destacarse el método de Goodpasture en huevo de gallina incubado, proporcionaron cantidades de material antigénico bastantes para la purificación y, por ende, para el empleo en la serología de las virosis.

El estudio de la capacidad antigénica de los corpúsculos elementales ha dado lugar al descubrimiento de los antígenos solubles. En inmunología reciben esta denominación un grupo de sustancias, específicas serológicamente, que no son el propio agente infeccioso y se encuentran en ciertas enfermedades producidas por virus o rickettsias. Los antígenos solubles no infecciosos difieren entre sí por sus propiedades químicas y físicas; se parecen por ser todos de pequeño tamaño, comparado con el del agente al que están asociados y poseer algunas, no todas, de las propiedades inmunológicas del agente intacto.

El que el antígeno soluble tenga menor tamaño que el virus o rickettsias que le originan, hace pensar que se trata de productos o fracciones de los mismos. Son más frecuentes en los virus más complejos y las rickettsias. El antígeno soluble fué descubierto por CRAIGIE (1932), en suspensiones hísticas ricas en virus vacunal. Esta sustancia no infecciosa se separa fácilmente de los corpúsculos elementales filtrando a través de un filtro Seitz, o por centrifugación a alta velocidad. Es demostrable por la reacción de desviación del complemento.

En colaboración con WISHART (1936) encontró que la sustancia soluble (AS) consta de un factor lábil (L) y otro estable (S), íntimamente combinados en las soluciones (L, S) que entran a formar parte de la superficie del corpúsculo elemental.

Trabajos posteriores dan a conocer un método sencillo de con-

centración y purificación parcial del antígeno L. S., por precipitación isoeléctrica.

Los antígenos L. S. purificados poseen las propiedades de una molécula proteica con un peso molecular de 240.000 (SHEBLOVSKY SMADEL, 1942).

Una característica importante de estos antígenos es que son específicos de los virus de que proceden e independientes del animal o medio de cultivo de los que se obtienen.

La proteína L. S. presenta, desde el punto de vista inmunológico, un gran interés, a pesar de no producir inmunidad ni anticuerpos neutralizantes del virus. Su importancia radica en que el antígeno L. S. es la primera molécula de proteína nativa capaz de provocar la producción de dos anticuerpos distintos. Por otra parte, los dos factores de la molécula pueden degradarse rápida e independientemente. El resultado de tal degradación demuestra que las partes del antígeno, serológicamente activas en la primera fase de la degradación, se combinan con el anticuerpo, pero no forman un precipitado visible; esta relación antígeno-anticuerpo puede demostrarse por la reacción de inhibición, que consiste en que el anticuerpo combinado no puede reaccionar con el antígeno inactivo que se añade a la mezcla.

Cuando la degradación del antígeno es completa, entonces no reacciona con el anticuerpo. Los virus de la viruela y vacuna aglutinan los glóbulos rojos, y esta propiedad eritroaglutinante parece estar unida a los antígenos solubles, y no a las partículas del virus (BURNET y BOAKE, 1946; BURNET y STONE, 1946).

Otro antígeno soluble extraído de los corpúsculos elementales de vacunas es el antígeno N. P. de naturaleza núcleoproteica, con un 6 por 100 de ácido timonucleico (SMADEL, RIVERS y HOAGLAND, 1942). Este antígeno provoca la formación de precipitina y aglutininas específicas; a estas últimas se las denomina aglutininas X. Los sueros con estos anticuerpos N. P. no neutralizan al virus, ni hacen a los animales resistentes a la infección. Al igual que el L. S. formaría parte de la superficie de los corpúsculos elementales.

Se ha encontrado también antígenos solubles en el grupo de virus de la psitacosis-linfogranuloma venéreo (LAZARUS y MEYER,

1939; HILLEMANN y NIGG, 1946). El antígeno del linfogranuloma sería una substancia de naturaleza glucolípida.

Hoy día se emplean antígenos solubles en clínica humana para el diagnóstico de varias enfermedades producidas por virus: coriomeningitis linfocítica, rabia, viruela, vacuna (alastrina), psitacosis, linfogranuloma venéreo, influenza A y B, etc.

La inmunología de las virosis es compleja. Los anticuerpos que producen y pueden comprobarse son varios y específicos. Con frecuencia se emplean en la identificación de los procesos virósicos, las reacciones de neutralización, desviación de complemento, cada vez más utilizable en clínica con fines diagnósticos, aglutinación y precipitación. Modernamente se usa la eritroaglutinación a 37° C. y a baja temperatura. Entre estas reacciones merece especial atención la eritroaglutinación o reacción de Hirst, por ser de uso frecuente en la metódica de los virus.

**Eritroaglutinación.** En 1942 dió a conocer HIRST la reacción de la aglutinación de los hematíes de pollo por el virus de la influenza. El mecanismo de ésta consiste en la fijación del virus al receptor del hematíe y en su destrucción por el virus. El virus se libera después espontáneamente y puede fijarse de nuevo a otros hematíes y aglutinarlos. El hematíe en el que se fijó el virus, por el contrario, pierde la capacidad de ser aglutinado por el mismo virus.

La capacidad de los hematíes de varias especies de animal de adsorber y eluir diversos tipos de virus, como el de la influenza, parotiditis, peste aviar, etc., tiene especial interés por proporcionarnos un buen método para el estudio del problema del mecanismo de la infección vírica y las relaciones entre el virus y el huésped. La elución de virus de los eritrocitos que lo fijaron lleva consigo la destrucción del *substrátum* del receptor al que se fijó el virus para aglutinarlos.

Es posible que la destrucción del receptor por el virus tenga lugar por un proceso enzimático, sin restitución del receptor una vez destruído.

Para aclarar el mecanismo por el que el virus destruye el receptor del eritrocito se han seguido distintos procedimientos. Unas veces se ha aislado el receptor del virus; otras, se han tratado eritrocitos intactos, con reactivos que inactivan el receptor, medio que nos proporciona algunos datos sobre su naturaleza química, y, por último, se han buscado sustancias análogas a las del receptor en otras fuentes biológicas.

El descubrimiento de que el virus de la influenza después de ser adsorbido por los hematíes puede eluirse fácilmente, hace pensar que posee un enzima capaz de inactivar una substancia receptora del eritrocito.

Los estudios de HIRST sugieren que el receptor es un mucoproteido, y que tanto la proteína como el nucléoproteido son necesarios para la combinación con el virus. En el suero normal existen también considerables cantidades de substancias receptoras que pueden adsorber el virus.

Los resultados obtenidos, por la acción del peryodato sobre las substancias receptoras, indican que en su composición intervienen los carbohidratos. BURNET y colaboradores estudiaron las reacciones de las mucinas con el virus de la influenza, logrando demostrar que una pseudomucinas y las substancias del grupo O inhiben notablemente la aglutinación de los hematíes por el virus de la influenza; esta inhibición se reduce cuando se incuba el virus y la substancia O.

GREENE y WOOLLY han encontrado, por otra parte, que los polisacáridos naturales, principalmente la pectina de manzana, inhiben la eritroaglutinación por el virus de la influenza y son capaces de prevenir la infección con este virus en embriones de pollo. Por nuestra parte, hemos podido comprobar, con nuestros colaboradores TOLEDANO y MARZAL, este efecto inhibitor de la pectina de manzana. Posteriormente, SNIBER, HUELER y HOSFLALL encontraron que el polisacárido capsular del bacilo de FRIEDMAN, de tipo B, bloquea la eritroaglutinación por el virus de las parotiditis, pero no la de los virus A o B de la influenza. Los eritrocitos tratados con carbohidratos conservan su aglutinabilidad aun lisados. En este caso, la acción tiene lugar entre los carbohidratos y los eritrocitos, bloqueando los

primeros, de una manera específica, los puntos receptores de los segundos.

La acción entre el virus y el carbohidrato no demuestra que la pectina de manzana, en concentraciones altas, favorezca la aglutinación de los eritrocitos por los carbohidratos. No es probable que los receptores sean del tipo de los polisacáridos.

Cuando se diluyen los eritrocitos en sueros con factor inhibidor, no se aglutinan por el virus si se lavan antes de que adsorban al inhibidor del suero.

Ha sido posible extraer de las células la substancia inhibidora del virus que es destruída en presencia de éste. Posiblemente se trata de la substancia receptora en solución (FRIEDEWALT, MÜLLER, WHATELEY y BOVARNICK).

Son muy semejantes la substancia receptora del virus y la de los grupos sanguíneos, en lo que se refiere a su insolubilidad en el agua. Las formas solubles en agua pueden encontrarse por doquier.

La propiedad descrita de destrucción del inhibidor por el perodato, hace que éste se emplee para eliminar, en la eritroaglutinación, el poder inhibidor del suero.

El procedimiento de inhibición de la eritroaglutinación por la pectina o la substancia inhibidora del suero, ha hecho posible el demostrar, titulando el poder de inhibición, que el virus sin calentar es capaz de destruir rápidamente al inhibidor del suero. Queda indudablemente por aclarar si no intervienen otros factores en la destrucción de la inhibición del virus.

De los estudios de HIRST se deduce, además, que el virus de la influenza calentado a 56° C., durante treinta minutos, pierde parte de su capacidad para aglutinar eritrocitos y su poder para eluirse de los mismos cuando ha sido adsorbido. El virus inactivado por el calor pierde la capacidad de destruir el inhibidor del virus del suero normal del conejo.

El virus, al fijarse a los hematíes, lo hace en los receptores de éste, y su acción es fija.

Posteriormente se ha demostrado que el virus de la enfermedad de Newcastle y el de la parotiditis se eluyen espontáneamente de los eritrocitos.

BURNET ha llamado la atención sobre las diferencias en la capacidad e intensidad de la fijación en los receptores de los virus de la influenza, Newcastle y parotiditis. Estas diferencias permiten establecer una escala continua que denomina "gradación de receptores". Un aspecto de esta gradación es que expresa la labilidad de los receptores cuando son atacados por dos virus o por una substancia presente en los filtrados de bacterias. Cuando se tratan los eritrocitos, durante poco tiempo, con un filtrado de vibrión colérico, no son aglutinados por los virus situados en las zonas bajas del gradiente y sí por los que están en las más altas.

Otro aspecto del gradiente es que los virus destruyen sus receptores y los de los que están situados por debajo de él, pero no los de los que están por encima. Esta gran especificidad sugiere que los receptores son complejos y están formados por varios componentes.

**Relación entre los virus y las unidades biológicas autorreproductivas.**

El problema de las partículas genéticas citoplásmicas, se ha desarrollado plenamente cuando se han definido las funciones del núcleo y construido el esquema de la herencia cromosómica.

Según DARLINGTON, desde el primer momento ha existido un desacuerdo entre los genetistas europeos y los americanos; estos últimos partidarios decididos de la teoría cromosómica, y aquéllos, defensores de la participación del citoplasma en la herencia. CORRES proporcionó ejemplos que no podían explicarse sólo por la herencia nuclear. BAUR explicaba las mezclas híbridas por un reparto desigual de plástidos. Los híbridos del ratón de Wettstein darán lugar a la noción de plasmona. En 1933, DARLINGTON proporciona su concepción de que todos los agentes autoplásmicos reproductores participan en la herencia, por ser capaces de transmitirse a través de las células germinales; propuso para todos ellos el término de "plasmagen".

Las relaciones con los virus son estrechas, por ser más semejantes a éstos que a los genes nucleares, y originarse con frecuencia de aquéllos, por un accidente de trasplatación. En realidad, serían

proteínas desplazadas más que a enemigos primitivos de la Naturaleza. Su evolución estaría sometida al equilibrio químico, a la repartición mecánica y a las mutaciones genéticas características de los elementos citoplásmicos.

El descubrimiento en el citoplasma del *Paramecium*, por SONNEBORN (1944), de una entidad capaz de autorreproducción que no es de naturaleza plástida, hace posible la generalización de esta teoría y su aplicación al problema de la etiología vírica del cáncer.

Las diferencias en la velocidad de propagación son debidas a los plasmagenes.

El estudio de las partículas citoplásmicas como elementos biológicos dotados de autorreproducción y continuidad genética, inicia una época en las relaciones entre los plasmagenes, microsomas, gránulos ribonúcleoproteicos y virus.

DARLINGTON clasifica las partículas citoplásmicas en tres grupos de distinto rango y significación biológica. El grupo superior jerárquicamente es el de mayor tamaño y está formado por las partículas de las plastidas de las plantas; centrosoma de los animales, etcétera. El segundo grupo comprende las partículas del tipo del genoide de la *Drosophila* y el factor "Kappa" del *Paramecium*, cuya velocidad de multiplicación puede controlarse por la temperatura y ser contada y medida.

Al tercer grupo, integrado por las partículas de menor tamaño, corresponden las moléculas libres, invisibles, únicamente demostrables por las experiencias de cruzamiento.

CLAUDE, por centrifugación a diferentes velocidades, ha separado de las células hepáticas de los mamíferos tres grupos de gránulos morfológica y bioquímicamente distintos: 1.º Gránulos grandes, de tamaño aproximado de 0,5 a 2,0  $\mu$  de diámetro, que corresponden a los gránulos de secreción y mitocondrias. 2.º Los microsomas, gránulos pequeños de un tamaño entre 50-200  $m\mu$  de diámetro. 3.º El sobrenadante, con partículas menores de 50  $m\mu$  de diámetro. La fracción que más nos interesa, por su relación con los virus, es la segunda. Los microsomas se analogan a los gránulos ribonúcleoproteicos, a los virus y a los plasmagenes.

El estudio de las diferenciaciones embrionarias ha permitido a

BRACHER analogar los gránulos ribonúcleoproteicos del citoplasma a los plasmagenes, e incluso a los virus. Con estos últimos estima tienen un estrecho parentesco, por contener siempre ácido nucleínico y ser de talla semejante. Por otra parte, CLAUDE obtiene también microsomas al tratar de purificar, por centrifugación a gran velocidad, el virus del sarcoma de Roux. Las partículas que obtenía a partir de embriones de pollo normales o inoculados con el virus de Roux, sólo se distinguían por ser o no infecciosas.

Los gránulos ribonúcleoproteicos tienen gran importancia biológica sobre todo, y además de su participación en el proceso respiratorio, por ser eslabones en la síntesis de las proteínas. Como el ácido ribonucleínico es uno de los principales constituyentes de los gránulos y por sí sólo no es capaz de elaborar proteínas, es probable que en la elaboración de éstas participe toda la molécula. La composición química de los gránulos encuadra perfectamente con las modernas teorías sobre el mecanismo bioquímico de la síntesis de las proteínas expuestas principalmente por COHEN y CHANTRENNE.

El estudio detenido de los gránulos citoplásmicos ha dado como resultado admitir en el protoplasma gránulos de diferente grosor. Los más pequeños son ricos en ácido ribonucleínico y pobres en enzimas; los voluminosos, identificados con las mitocondrias, son mayores, contienen numerosos fermentos y poco ácido ribonucleínico. CHANTRENNE admite que los gránulos más pequeños son casi puros de ribonúcleoproteidos. La complejidad va aumentando con la talla; los gránulos que no contienen más que fermento respiratorio son los más pequeños y se relacionan mucho con los virus; incluso se cree son capaces de automultiplicarse. Una diferencia clara con los virus sería el aumento constante de la talla en su evolución.

Si los gránulos ribonúcleoproteicos poseen caracteres análogos a los de los plasmagenes, habrá que admitir la posibilidad de autorreproducción de los mismos. Los microsomas de CLAUDE son capaces de multiplicarse. Lo demuestra la presencia de racimos y cadenas en la observación hipermicroscópica. Este tipo de experimentación tiene el inconveniente de que el tratamiento drástico que se da a los preparados produce artefactos que complican la imagen y dificultan las conclusiones. Para evitar esto, BRACHER y colaboradores han



empleado dos métodos; con uno demuestran la multiplicación de los gránulos, inyectando una suspensión de éstos en un huevo de rana al principio de la segmentación, y buscando, después, la basofilia de las células aisladas del blastómero. El otro tipo de experiencia, más en relación con las técnicas empleadas en el cultivo de virus, consiste en depositar una gota de una suspensión de gránulos sobre la superficie de la membrana corioalantoidea de un embrión de pollo. En el examen de la membrana, después de la inoculación, se aprecia la presencia de un espesamiento considerable del epitelio, cuyas células presentaban un notable aumento de la basofilia del citoplasma y del nucléolo.

Hoy día es difícil precisar si los gránulos ribonúcleoproteicos son análogos a los plasmagenes, e incluso si deben llamarse así. Se consideran como productos de actividad nuclear, de pequeño tamaño, ricos en ácido ribonucleínico, pobres en enzimas y capaces de multiplicarse, como los virus, y aumentar de volumen por la adición de fermentos. Los gránulos más grandes, pobres en enzimas respiratorios, serían los agentes de proteínas específicas, y, por consecuencia, de la diferenciación embrionaria.

DARLINGTON sugiere que existe una analogía entre sus partículas, los genes nucleares y los virus, los cuales se diferencian por estar *combinados con el ácido desoxirribonucleínico, en oposición a la ribosa*. Esta distinción no puede aplicarse a los plasmagenes, por la falta total de ácido ribonucleínico cromosómico en el citoplasma.

Las diferencias entre los virus y los otros componentes celulares se evidencian cuando las proteínas víricas manifiestan la propiedad de reproducirse y modificar la fisiología de la célula huésped. No se sabe el mecanismo íntimo del proceso; los virus no poseen sistemas enzimáticos y actúan, probablemente, influenciando los de la célula huésped, cuyo metabolismo desvían. Los virus como entidades con continuidad genética, se diferencian claramente de las proteínas que no se reproducen. Según BAWDEN, esta distinción está desprovista de valor, porque en la escala de los constituyentes celulares submicroscópicos no podemos distinguir entre producción y reproducción, y la única distinción real entre los virus y algunos constituyentes ce-

lulares es que los primeros pueden desarrollarse en células en las que normalmente no son habituales.

Según este investigador, no existe ninguna prueba positiva del origen de los virus a partir de los componentes normales de la célula; la identificación con éstos es pura especulación. Los virus como agentes patógenos se comportan exactamente igual que las bacterias y los hongos, pero esta analogía no autoriza a admitir que, como éstos, poseen sistemas que les hacen capaces de tener un metabolismo independiente. Parece más lógico pensar que la célula infectada es el sistema reproductor y las partículas de virus uno de los determinantes que deciden el comportamiento global de la célula. A pesar de no conocerse bien el mecanismo de multiplicación de los virus, es un hecho indudable que la penetración de virus en las células receptoras provoca su formación. La mayor parte del virus neoformado es igual que el que causa la infección, aunque no siempre es así, por ser a veces diferente.

Es difícil la distinción entre plasmagenes y virus. DARLINGTON distingue virus y provirus. Las partículas víricas se caracterizan por ser infecciosas naturalmente y, por tanto, por adaptación. Los provirus serían infecciones experimentales y no puede distinguirse de los plasmagenes (DARLINGTON, 1948, y DARLINGTON y MATHES, 1949). En el grupo de los provirus se encuentran agentes que existen a la vez en las plantas, animales y bacterias. En las primeras aparecen únicamente por injerto, como en la patata King Edward. En las bacterias son los bacteriófagos y los agentes lisógenos de los estafilococos, y en los protozoos están representados por las propiedades infecciosas de los plasmagenes Kappa de los Paramecios. La reproducción de estas partículas depende de las especies en que las encontramos y se seleccionan por las ventajas que proporcionan al huésped y no por las suyas propias.

La aplicación de esta clasificación a la etiología del cáncer se ha hecho como sigue: En la formación de los tumores intervienen también las tres categorías de factores que lo hacen en la herencia, desarrollo e infección, demostrables por su comportamiento en el citoplasma y sin relación con la formación de los tumores. La categoría naturalmente infecciosa, el virus verdadero está representado por

el del papiloma de Shope en el conejo, y las verrugas en el hombre. El provirus, o categoría experimentalmente infecciosa sería el sarcoma de Roux. Otra categoría sin poder infeccioso conocido sería el plasmagen puro, a la que corresponden la mayor parte de los tumores espontáneos e inducidos de los mamíferos.

El virus genuino asienta en el citoplasma. El virus plasmagen proviene de la mutación de éste por los cancerígenos. El grupo provirus establece el puente de unión entre las anteriores. La posibilidad de una transmisión experimental demuestra que el agente causal está en el citoplasma; por otra parte, la ausencia de transmisión natural prueba que este agente debió aparecer, en su origen, en el organismo en el que se descubrió por primera vez.

Una situación intermedia correspondería a los cánceres espontáneos de mama del ratón, cuya aparición está condicionada por la herencia y la infección (factor lácteo).

Los cancerígenos químicos producirían los tumores por mutación citoplásmica y no por su acción sobre el núcleo, porque las radiaciones débiles capaces de provocar cambios de los genes nucleares no producen tumores (DARLINGTON, 1948). Las nuevas experiencias de ROPP y GAUTHERET (1948) sobre las plantas proporcionan un argumento irrefutable del origen por mutación de los tumores y virus.

GAUTHERET ha descubierto en 1948 que si se trata el tejido de diversas especies de plantas por héteroauxinas o se infectan por el *Phytomonas tumefaciens*, se produce una modificación del estado de las células, que se transmite en la multiplicación celular y algunas veces por contacto. Esta modificación podría interpretarse según GAUTHERET como una mutación o por la formación interna de un virus nuevo. DARLINGTON es más decidido y no duda interpretarlo según su concepción del provirus. Esto es, la bacteria y el tratamiento por la héteroauxina no hacen más que transformar, por mutación genética, una proteína celular normal, o plasmagenen, en un provirus.

El estudio de la desdiferenciación citoplásmica de las células tumorales es apropiado para aclarar la diferenciación en el desarrollo normal. En la célula tumoral parece como si gran número de pro-

teínas celulares fuesen incapaces de mantener el nuevo ritmo de crecimiento, por escasear, al proceder directamente del núcleo y no poder producirlas éste en cantidad bastante, al sustraerle los plasmagenes mutantes parte de los materiales citoplásmicos que el núcleo aprovecha para formarla.

Para terminar, diré las recientes experiencias de LETTRÉ, con homogeneizados de tumores, en los que establece la participación de las granulaciones citoplásmicas en las trasplantaciones positivas de tumores.

Lo más interesante de los trabajos de LETTRÉ son las experiencias con células tumorales libres de granulación citoplásmica. Este investigador elimina las mitocondrias de las células tratándolas con agua destilada.

Las células tumorales, así tratadas, contienen todavía el núcleo y citoplasma, pero éste sin granulaciones. La trasplantación de estas células no da lugar a tumores, por no ser capaces de crecer ni regenerar sin las granulaciones citoplásmicas. Con las mitocondrias solas, tampoco se consiguen tumores, pero si se mezclan las células sin granulaciones con sus granulaciones citoplásmicas aisladas, entonces se obtienen de nuevo tumores. Las granulaciones pueden unirse a las células sanas y proporcionarles capacidad de crecimiento, probablemente por ser portadoras las mitocondrias de importantes fermentos para el metabolismo celular. Estas experiencias demuestran que estos componentes citoplásmicos son imprescindibles para el crecimiento y división de la célula; tienen gran importancia para aclarar la etiología vírica de los tumores. Las granulaciones solas no son patógenas, los virus sí. Las granulaciones se comportan como patógenas frente a las células de las que proceden, proporcionándoles un crecimiento sin límite.

Una situación análoga es la de los virus tumorales. El virus, al penetrar en la célula, le proporciona el impulso necesario para crecer ilimitadamente. Otra analogía entre el modo de comportarse las granulaciones aisladas y los virus la tenemos en su especificidad. Las primeras sólo pueden completar a las células de las que proceden; los virus demuestran su carácter patógeno frente a las células específicamente receptibles.

Estos experimentos son un modelo que demuestra el comportamiento viroide de las granulaciones citoplásmicas. La mayor dificultad que encontramos para establecer, con claridad, la génesis vírica de los tumores, es la falta de un criterio para caracterizar los virus.

En algunos casos es indudable su existencia, pero ésta no permite una generalización, sin más. El desconocimiento sobre la relación entre la multiplicación de las mitocondrias y las células, hace imposible deducir si la multiplicación celular ilimitada se realiza según la hacen los virus en el interior de las células.

Consideramos de gran interés los hechos que demuestran la posible transformación de las granulaciones citoplásmicas en productos capaces de producir alteraciones que se manifestaran en enfermedades, con las que habrá que hacer un nuevo grupo.

He dicho.

# CONTESTACIÓN

DEL

EXCMO. SR. D. GREGORIO MARAÑÓN

SEÑORAS Y SEÑORES:

**La eficacia del verbo.** Si D. Julián Sanz Ibáñez, que ingresa hoy en esta Real Academia, no fuera, como es, conocido y admirado en el mundo científico, bastaría el discurso que acabamos de oír para considerarle indiscutiblemente merecedor del sillón para el que ha sido elegido. Arduo por todo extremo el asunto de su disertación, lleno de zonas confusas, como tantos otros capítulos recién abiertos a la poderosa investigación de nuestros días, acaba de darnos una lección patente de la profundidad de sus conocimientos, y de su magistral aptitud para exponerlos.

La vida científica del nuevo académico, relativamente breve porque apenas ha transpuesto los límites de la madurez, es, sin embargo, copiosa en sazonados frutos y en eficaces actividades. Sanz Ibáñez es aragonés, de la promoción de grandes investigadores que nos ha dado aquella tierra, después de haber dado a España y al mundo a D. Santiago Ramón y Cajal. Gran ejemplo que demuestra hasta qué grado se extiende la influencia del hombre de excepción sobre el medio en que vive y en el tiempo que le sigue. En otra ocasión he hecho este mismo comentario, que me es grato repetir cada vez que la ocasión se presenta porque reafirma mi fe en la eficacia del verbo humano, cuando en él alienta el desinterés y la pasión por la verdad.

La propaganda artificiosa, la que fía el éxito a la perfección de las técnicas de difusión, tal como hoy se realiza en tantos aspectos de la vida, con fines industriales o políticos, puede producir efectos sorprendentes; pero están irremisiblemente condenados a morir. Es

más, el monstruoso auge que la propaganda ha alcanzado en la sociedad actual empieza a mostrar su contrafilo; es decir, empieza a marcar desde el primer momento al objetivo de sus ruidosas apologías con un estigma de presunta vacuidad. Los que organizan las propagandas cuentan con la inferioridad mental de las multitudes. Pero es de esperar que pronto, hasta las multitudes se convenzan de que la verdad digna de regir nuestra conducta es sólo la que elabora la razón, y no la que se nos da manufacturada en una oficina.

Lo que un hombre genial o simplemente honesto, bien intencionado y entusiasta, crea con su palabra y con su acción, es siempre fructífero; pero sobre todo es perdurable. Y así, cuando tantas otras cosas que arrebataron de entusiasmo, en su día, a las gentes se nos aparecen hoy sepultadas en la lejanía del recuerdo, Cajal y su obra continúan enhiestos, no sólo manteniendo su vigencia inicial sino acrecentándola de día en día.

Aparte del sentido universal de su obra, Cajal dejó un fermento creador, humano, de misteriosa virtud, en Aragón. Como Menéndez Pelayo en Santander o Leopoldo Alas en Asturias o Unamuno en Salamanca. Por qué y cómo ocurre esto, no lo sabemos; pero no puede ser casual el hecho de que, aparte de su hermano, hayan sido coterráneos de Cajal, Tello, Lorente de Nó, Sanz Ibáñez y alguno más de los que han contribuido e ilustrado su obra de creación biológica.

**Vida científica del Profesor Sanz Ibáñez** Desde los comienzos de su carrera, dirigió Sanz Ibáñez su actividad preferente a la Histología y Anatomía Patológicas, primero como interno de esta asignatura, en Zaragoza, donde se hizo médico; y después, ya en Madrid, como ayudante de prácticas, como profesor auxiliar (1932) y como Catedrático de Anatomía Patológica, en la Central, desde 1945, tras haberlo sido en Santiago de Compostela. Añadiré, para ser exacto, la consabida coletilla enfática de que fué todo esto "por oposición", aunque para mí esto de la oposición no agregue nada a su merecido ascenso a las alturas pedagógicas.



Completó sus estudios en el extranjero, aprendiendo con el profesor Fischer la técnica de los cultivos de tejidos, en el Instituto Kaiser-Wilhem de Berlín (1929), pensionado por la Facultad de Medicina de Zaragoza, y, a continuación (1932-33), en el Instituto Neurológico de Viena con el Profesor Marburg. A su regreso a España, fué Jefe del Servicio de Histopatología y cultivos de virus en el Instituto de Rockefeller, en Madrid, y Jefe del Servicio de Oncología de la Dirección General de Sanidad. El propio Cajal le designó para Jefe de Sección del Instituto de su nombre, y de él es actualmente Director, a partir de 1945. Desde 1946 dirige, en fin, el Instituto del Cáncer.

De su labor en todos estos puestos son exponentes decisivos los frutos pedagógicos de su gestión y sus publicaciones, sólidas, varias de entre ellas consideradas ya como autoridades, cuya enumeración se verá al final de estas palabras mías.

**D. Juan Marcilla.** He aquí el retrato del hombre de ciencia, lleno de méritos y de posibilidades, que viene a colaborar en nuestras tareas, ocupando el sillón que dejara vacante D. Juan Marcilla Arrazola, de cuyos méritos acabamos de oír cumplido y merecido elogio. Quisiera yo sumarme a él, con la máxima cordialidad. Marcilla fué prototipo de esos hombres de ciencia cuya vida transcurre en una penumbra provechosa, inaccesible al grato pero siempre peligroso y a veces letal halago de la popularidad. Y, precisamente por eso, debemos adherirnos todos en esta solemnidad, que en parte lo es porque la ilumina su recuerdo, al fervoroso homenaje que el Dr. Sanz Ibáñez le acaba de dedicar.

La gente de la calle identifica la ciencia y sus progresos con los hombres señeros, con los grandes descubridores cuyas frentes, ornadas de laurel, ascienden, como los altos picos de los montes, hasta alcanzar las nubes. Pero, como gustaba de decir Cajal, cuyo recuerdo, vivo en todas partes lo está especialmente aquí, esas cimas enhiestas no brotan porque sí de la llanura, sino de la masa de las cordilleras, hechas de montañas menores, sin nombre de resonancia universal. Esas cordilleras que sirven de sustento al genio rarísimo, es-

tán formadas por el sabio modesto, de callada labor, que crea en torno suyo sugerencias e intereses accesibles a todas las mentes y que transmite su afán a los discípulos innúmeros, que formarán el ambiente científico, sin el cual el mismo genio tiene sólo esporádica utilidad.

**El ambiente científico.** En este mismo recinto resonaron las palabras del maestro en aquel su memorable discurso de entrada hace ya casi cincuenta años, que sigue siendo un decálogo y un guía para los estudiosos de España. Su principal preocupación, entonces y siempre, era precisamente el señalar la importancia del hombre de ciencia modesto como elemento imprescindible a la creación del ambiente sin el cual la creación, el hallazgo, es, lo que nunca debe ser, una hazaña, y no lo que debe ser, una noble rutina. Honramos la memoria del gran histólogo renovando su preocupación, hoy, en esta Academia de la que yo le oí decir que era la más grata a sus simpatías; porque, acaso, en la huella que Cajal ha dejado entre los españoles hay más de culto entusiasta a su genio, que de eficaz y colectivo propósito de alistarse en esos batallones de técnicos, de hombres sencillamente preocupados por el trabajo científico, sin temor al anónimo, productores, como se dice ahora, de una partícula de la verdad que más tarde el genio, reuniéndola con otras muchas, convertirá en resonante hallazgo.

Marcilla fué un gran investigador, y un gran maestro, y a sus importantes hallazgos, principalmente en el terreno de la Viticultura y Enología, unió, para merecer el homenaje que hoy le tributamos, esa generosa capacidad de contagio y emulación en el afán de saber que crea los adeptos numerosos; es decir, el ambiente, y, por lo tanto, la futura posibilidad del descubridor excepcional.

**La ciencia práctica.** Alabemos finalmente el aspecto práctico de su sabiduría. La verdadera grandeza de la ciencia acaba siempre valorándose por su utilidad. El gran descubridor parece un hombre distraído, para el que no cuentan las

realidades de la existencia de cada día. Pero de sus descuidos y de sus distracciones surge, a la corta o a la larga, todo aquello que él, el sabio, no echaba de menos, pero los demás, sí: el viaje rápido, la comunicación instantánea con el Continente lejano, la desaparición del dolor o de la enfermedad, la muerte de los insectos que molestan o inoculan; o, en fin, el buen vino, obra prodigiosa de Dios, de todos modos perfecta, pero de excelencias afinadas por el ingenio y el trabajo del hombre de ciencia. Marcilla, como el Dr. Sanz Ibáñez nos ha recordado, dedicó buena parte de su preocupación y de su talento a mejorar los vinos españoles, divino don de nuestra Península que nos llega con el sol, el cual, al acariciar las vides de nuestro viejo mundo parece traer en sus rayos una vitalidad contagiosa, hecha de creadora antigüedad. Los vinos excelentes de España, que hoy pueden exhibir sus cualidades con fortuna, en la mesa elegante o en el mesón popular, deben, en gran parte, su situación privilegiada, acabáis de oírlo, a las investigaciones de Marcilla.

Por esto y por todo lo demás que hizo y por la noble silueta de su vida, añado ahora un recuerdo más, lleno de fervor, a los que Sanz Ibáñez acaba de dedicar a su memoria.

**El tema de la terminología, antes y ahora.** Y ahora, la tradición aconseja, casi exige, que sea comentado por el académico receptor el contenido doctrinal del discurso del académico que llega. Mas, en la ocasión presente, son muchas las razones para que yo omita ese comentario, que suele ser casi siempre forzado y un tanto pedantesco. Porque lo normal es que el autor del discurso diga sobre el tema todo lo que se debe decir; de suerte que el que contesta ha de limitarse a algunos alardes de su ingenio, cuando le tiene, y añadir algunos datos, fáciles de encontrar en los repertorios bibliográficos, a los expuestos por el flamante académico. Con todo lo cual puede darse una impresión de competencia no enteramente exacta que, aunque aceptable, en el protocolo académico, que tiene mucho de artificiosa ceremonia, no debe admitirse en esta Casa, consagrada a las Ciencias Exactas y

a las Naturales, que no son exactas pero que viven en perpetua aspiración de serlo.

El problema de los virus, tal como la realidad lo plantea, hoy, es uno de los de más atrayente novedad en las ciencias biológicas. Está la ciencia de los virus en pleno período de formación; y con tal acúmulo de hechos nuevos y del inevitable acopio de hipótesis que acompañan a los rápidos avances de la ciencia, que, como el Dr. Sanz Ibáñez dice, todo ese material se nos presenta con apariencia, más que compleja, tumultuosa.

Le falta aún a esta rama de la ciencia incluso una terminología consagrada. Hablan los autores de *virosis*, *viropatías* y de *virópatas* y, en fin, de *elementos víricos*, *virósicos* y *viroides*, etc.; vocablos todos que será inútil buscar en los diccionarios corrientes, muy rigurosos todos ellos en la cuarentena que imponen a las palabras nuevas, esperando a que las sancione el lenguaje vulgar. Y aprovecho la ocasión para expresar mi convencimiento de que las Academias y Centros encargados de velar por el lenguaje no siempre proceden bien al hacerlo así, porque, no pocas veces, y sobre todo en el terreno científico, esa sanción del pueblo recae sobre vocablos de notoria inexactitud.

El Diccionario oficial de la Lengua Española, glorioso por tantos otros motivos, ostenta como lema uno que me atrevo a calificar de no enteramente oportuno, a pesar de haber alcanzado una popularidad de sentencia, sin duda porque, como le ocurre a tantas otras sentencias, proverbios y refranes, y como a los lemas de los antiguos blasones, su aceptación y su conversión en dogma se ha hecho no a favor del contenido sino a favor de la música, de la eufonía de las palabras. "Limpia, fija y da esplendor", reza ese lema. Pero en realidad la principal función de los organismos que velan por la corrección del idioma no es limpiar y fijar y sacar el lustre al lenguaje establecido, en una actitud de ama de casa cuidadora, sino crear a tiempo la palabra exacta que conviene a los hechos y a las ideas nuevas. Adelantarse, en suma, a la sanción empírica de la calle, la cual, repito, tiene más en cuenta el garbo de la palabra que su exactitud.

Es evidente que esta actitud activa, creadora y no sólo de vi-

gilancia pasiva, en los organismos responsables del idioma, adquiere particular importancia a medida que el mundo evoluciona; pues uno de los signos de la crisis de nuestro tiempo es precisamente el ocaso de la literatura, a la que corresponde el lema de "limpiar, fijar y dar esplendor" a lo ya creado; y, frente a ese ocaso, el apogeo de la ciencia, cuyo lema, en el orden lingüístico, debe ser "crear con exactitud". Un tiempo llegará en que en las Academias de la Lengua el literato que antes era su casi único componente, sea sólo un miembro no más importante que el técnico en Física, en Matemáticas, en Ingeniería, en Ciencias Naturales. Y convendría que todo esto se hiciera con rapidez, pues ya hoy uno de los grandes obstáculos para el progreso científico es la anarquía con que el vocabulario técnico se ha creado y se ha admitido, aplicándole el mismo criterio empírico que al lenguaje popular y a las creaciones de la retórica. Con satisfacción puedo decir que este espíritu es el que hoy empieza a prevalecer en la Real Academia de la Lengua Española.

Perdóneseme esta digresión no del todo inoportuna, ya que la ciencia de los virus entra de lleno entre las actividades que necesitarían una rápida ordenación de su vocabulario; y ya que nos hallamos en un ambiente académico en el que, junto con la preocupación de sus disciplinas específicas, debe existir la preocupación terminológica, que es también ciencia, y de la más alta calidad.

**El peligro de los temas nuevos.** La admirable exposición doctrinal que acaba de hacer el Dr. Sanz Ibáñez, merece, ante todo, nuestro entusiasta elogio por su oportunidad. Ahora, todo el mundo habla de virus, y son pocos los que conocen el complejo montón de problemas que se esconde en esa denominación. Como es natural, somos los médicos los que con más entusiasmo, a veces tocado de ilusionada inconsciencia, nos hemos entregado a las realidades y a las esperanzas de las nociones sobre los virus. Los médicos vivimos en la perpetua tragedia, como hace un momento decía, de querer dar un perfil de exactitud a nuestra ciencia, radicalmente empírica y, por lo tanto, radicalmente inexacta.

Adviértase, ante todo, que abusamos todos del sentido peyo-

rativo de la palabra "inexacta". Lo inexacto tiene una realidad tan digna como lo exacto. Una ciencia puede ser inexacta y levantar su frente con el mismo orgullo que las engréidas ciencias que se titulan exactas. Y eso, en primer término, porque la exactitud de las ciencias exactas está siempre sujeta a revisión; pero, sobre todo, porque lo que cuenta en la ciencia, que es la investigación de la verdad, no es la exactitud de los resultados, sino el afán y la pulcritud del esfuerzo; y este afán y esta pulcritud pueden ser aún mayores que en las ciencias exactas en las inexactas, precisamente por los mismo que lo son.

Es esto compatible con la preocupación que el naturalista y, desde luego, el médico tienen de resolver sus problemas según fórmulas exactas; de donde el entusiasmo, a veces desorbitado, con que acogemos los conocimientos nuevos que se presentan aureolados de precisión. Todo el esfuerzo de la Medicina del último siglo, siglo al que debe un progreso tan grande casi a todo el resto de su historia, se ha encaminado a convertir el arte de curar en una operación exacta, mecánica, casi matemática, cuyo arquetipo estaba representado por la clínica de las enfermedades infecciosas.

Ante una infección, en efecto, la aspiración del médico consistía en realizar un diagnóstico biológico, una aglutinación, una desviación del complemento, un hemocultivo, que nos decía, sin otro esfuerzo que el leer el boletín enviado por el laboratorio, el nombre del microbio responsable y, a veces, el grado de su virulencia. Conocidos estos datos, estaba ya implícita la elección del suero, de la vacuna, del producto quimioterápico o del antibiótico rigurosamente correspondiente; a veces, hasta la dosis quedaba prefijada en los análisis. Y el médico no tenía más que hacer que cubrir con su responsabilidad los resultados del Laboratorio.

Alrededor de esta ilusión revolotean los afanes de los clínicos, como mariposas, aproximándose unas veces a la luz de la supuesta verdad y alejándose otras. Cada nuevo hallazgo reanima a los optimistas, rebasando casi siempre los límites exactos de lo que juiciosamente se puede esperar. Y esto ocurre ahora con los virus, cuyo conocimiento profundo requiere incluso una preparación de la física más fina y de las matemáticas. La humillación que durante largos

años hemos experimentado teniendo que confesar ante un enfermo febril que ignorábamos la causa de su mal; o la humillación, aún más profunda, de colocar sobre un hecho clínico, un nombre rimbombante para ocultar nuestra ignorancia, se compensa ahora anunciando, unas veces con cierta seguridad, otras con certeza prematura, que el enfermo que sirve de problema sufre de una virosis o viropatía.

**Realidad y mito del virus.** El virus es hoy una palabra mágica, que empieza por satisfacer al que sufre, porque la curación, en la que hay siempre un factor psicológico, se inicia, muchas veces, tan sólo al poner un rótulo a la enfermedad; y satisface a la vez la conciencia del médico o cuando menos su subconsciencia; o quizá, sólo su vanidad. Desde luego es excepcional el llegar a adquirir la prueba de que el virus que se ha diagnosticado está ahí. Pero esto no obsta para que sigamos atribuyendo a los virus todo lo que no se explica por las hipótesis patogénicas habituales. Y esto no lo digo con ironía o con saña, porque tal actitud es casi siempre expresión, no de pedantería o de cinismo, sino de auténtico y respetable entusiasmo para sustituir una ignorancia por una verdad; y bueno es no olvidar que si el infierno está empedrado de buenas intenciones, las buenas intenciones son, en cambio, material excelente e indispensable para la conquista de la verdad.

Además, no sabemos después de todo si se ha exagerado el papel patógeno de los virus o si, por el contrario, todas las exageraciones son pocas para lo que ocurre en la realidad. Es posible que esto último sea lo exacto. Mas ello no invalida el que el clínico tenga el deber de atenerse a la realidad, o lo que es lo mismo, que ha de informarse rigurosamente de lo que en el estado actual de nuestros conocimientos representan los virus y de lo que lógicamente se presume que puedan representar en la patología del porvenir.

Ningún texto será más útil, como introducción a este conocimiento que es el discurso del Dr. Sanz Ibáñez. El tema, decíamos, es arduo, difícil de sistematizar y, a trechos, difícil de comprender;

y el autor de la disertación que acabamos de oír, que es como un apretado esbozo de un libro futuro, ha sabido realizar, de modo perfecto, la conversión de tanto conocimiento insistemático en una lección de diáfana pedagogía.

Ojalá que todos lo lean, porque el escollo actual ante el formidable avance de la Medicina no es que los asuntos sean complicados, sino el que los médicos quieran resolverlos valiéndose, tan sólo, de esas informaciones extractadas que se leen entre visita y visita, gracias a los noticiarios de estrictas conclusiones, que tanto abundan hoy, porque la necesidad los exige, pero de los que abusan los editores. Su principal peligro estriba en que suprimen la actividad más fecunda del pensamiento, que no es recibir las conclusiones ya digeridas de los problemas, sino elaborar por el razonamiento individual las conclusiones que se desprenden de unos hechos que hay que empezar por conocer a fondo.

**La naturaleza del virus.** En otro discurso mío de contestación, en la Academia de Medicina, a un querido amigo y compañero nuestro de esta misma Casa, comentaba yo el asombro que produce el conocimiento del papel rector de las más importantes funciones del organismo y de la vida misma ejercido por los elementos infinitamente pequeños: los enzimas, las vitaminas, las hormonas, los oligoelementos. A esta misma admiración induce la lectura de lo que son y de cómo actúan los virus. Todo cuanto se refiere a su naturaleza está todavía en la penumbra de esas soluciones que parecen inminentes pero que no acaban de cristalizar. La Biología actual está llena de embarazos a término cuyo desenlace se retrasa; y uno de ellos es el problema de los virus, del cual dependen, a su vez, otros de fundamental importancia, como el de la naturaleza de muchas infecciones cuya causa desconocemos y de no pocas otras enfermedades, viscerales, principalmente del sistema nervioso, pero también de otros territorios; y probablemente el misterio del cáncer mismo. Pero cualquiera que sea esa naturaleza ignota, es indudable la asombrosa capacidad de acción de los virus, sean proteínas de alto peso molecular o no; mo-



léculas dispersadas de las células o autóctonos elementos vivos.

El virus, diminuto e invisible, se fija, por adsorción, en las células vivas o en las mismas bacterias, y puede dar lugar a la enfermedad de aquellas células o a su curación, por lisis de las bacterias invadidas. Y todo este proceso, regulado por complejas leyes electrostáticas, ocurre en zonas tan profundas del proceso vital que aparecen, a la mente del investigador clásico, como un mundo nuevo, mucho más allá de lo que se consideraba, todavía hace un siglo, como finis terre de los conocimientos humanos. Mas a medida que se profundiza en esa sima oscura y atrayente, en cuyo fondo se adivina el origen mismo del misterio de la vida, los fenómenos más complejos aparecen explicados no por abstrusas razones, sino por nociones de un mecanismo relativamente elemental. Y así, una de las más finas propiedades de los virus, que es su rigurosa especificidad para fijarse en determinadas células vivas o en determinadas bacterias, se debe, como acabamos de oír, a que en la superficie minutísima del virus existen agrupaciones iónicas de número y distribución singular, capaces de unirse con las cargas iónicas de las células, de las bacterias, del medio, que corresponden exactamente con aquellas agrupaciones y no con las demás. Cada molécula vírica es, pues, como una invisible central que, en unión de todas las demás, regula, allá en lo más profundo, los trastornos vitales que a nuestros ojos aparecen como enfermedades de síntomas llamativos y de tumultuosa evolución.

Al lado de esto, parecen sucesos simplicísimos las manifestaciones gigantescas de la vida de los mundos, en las que la mente antigua reconocía, y sólo en ellas, la presencia y el poder infinito de la Divinidad.

**Porvenir del problema del virus.** No puede, en suma, extrañarnos la impresión que hace la audición o la lectura de estudios como el que acabamos de escuchar. Para cualquier espíritu maduro y no enteramente frívolo, tienen la misma apasionante atracción que las aventuras fantásticas para la mente de los niños. Y este interés se completa, en

la disertación que hemos escuchado, con la interpretación de los fenómenos de eritrosedimentación que tanta importancia, teórica y práctica, tienen ya y pueden tener mañana; con el estudio de las relaciones entre los virus y las partículas genéticas de los citoplasmas, los plasmagenes, que nos conducen a la consideración de problemas de tanta trascendencia biológica como el origen nuclear o protoplasmático de los cromosomas que rectoran el proceso de la herencia; como la relación de los plasmagenes y los virus; y como la interpretación, a la luz de estos conocimientos, del magno capítulo, de la Biopatología actual, que es la génesis del cáncer.

Sin recurrir al tópico, puede afirmarse que un mundo nuevo, el mundo de los virus, se abre ante el afán del investigador. Las soluciones que su estudio pueda aportar a conflictos que hoy afligen a la vida de las plantas, de los animales y, sobre todo, del hombre, no se pueden prever. Es seguro que serán muchas y trascendentes. Pero con ser tan importante el aspecto pragmático del gran misterio que se empieza a descorrer, lo que a todos nos subyuga es que el misterio deje de serlo; porque al fin el progreso humano no modificará lo esencial de nuestro destino material que es, de un modo o de otro, vivir y morir; mientras que lo que nos eleva de lo inexorable de ese destino y nos acerca sin limitaciones y sin medida al más allá, es la pasión de conocer y la alegría incomparable de conseguirlo.

Esta es la noble misión de tantos focos de hombres admirables que nos hacen olvidar, esparcidos por todo el mundo, lo que en éste hay todavía de injusticia y de dolor. Nuestra Academia es uno de esos recatados y augustos lugares. Sea bien bienvenido a su recinto nuestro nuevo e ilustre compañero.

## TRABAJOS PUBLICADOS POR EL PROFESOR SANZ IBÁÑEZ

1. "Estudio sobre el cultivo de tejido nervioso *in vitro*". *Revista Universidad de Madrid*.
2. "Ciclo evolutivo de los productos de secreción en las zonas cultivadas *in vitro*". (Memoria Doctoral).
3. "Zur Frage der Tuberschädigung bei Adipositas". *Arb. Neur. Institute*. Viena, 1933.
4. "Histopathologie de l'encéphalite post-vaccinale expérimentale". *Trab. Inst. Lab.* Universidad de Madrid, 1934.
5. "Estudio experimental sobre el sueño". *Arch. Neurobiol.*, 1934, tomo XIII, núms. 4-6.
6. "Neurohipófisis. Sistema hipófisis-diencefalo". *Arch. Neurobiol.*, 1934, tomo XIV, núm. 4.
7. "Sur les éléments nerveux dans la neuro-hypophyse". *Trab. Lab. Universidad de Madrid*, 1934, tomo XIX.
8. "Contribution a la connaissance de la glande diencephalique". *Trab. Lab. Universidad de Madrid*, 1935, tomo XXX.
9. *Etude de la dégénération du fascicule tegmental de Gudden consecutif a la lésion expérimentale du noyau mamillaire externe*. Madrid, 1935, tomo XXX.
10. *Les altérations histopathologiques dans l'encéphalite guadinique expérimentale, Encéphalose avec création gliale proliférative*. Madrid, 1935, tomo XXX.
11. *Dégénération ascendante du pedoncule mamillaire*. Madrid, 1938, tomo XXXII.
12. "Estudio biológico del tifus exantemático murino e histórico". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1940, tomo XXXII.
13. "Resultados obtenidos por la inoculación de material tracomatoso en alantoides". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1940, tomo XXXII.
14. "Estudio sobre la "substancia de Golgi" en las células cultivadas *in vitro*". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1941, tomo XXXIII.
15. *Poliomiélitis experimental*. Premio "Francisco Franco" de Ciencias, de 1943. Madrid, 1944.
16. "Estudio de la sinapsa mioneural experimentalmente y en biopsias de músculos humanos paralíticos". *Pub. Cirugía del Aparato Locomotor*. Madrid, 1944, vol. 1.º, fasc. 3.º.

17. "Modernas investigaciones sobre la poliomiélitis (parálisis infantil)". Pub. en la *Revista Arbor*. Madrid, 1944.
18. "Datos experimentales sobre el cultivo de la rickettsia Prowazeki en la membrana vitelina del embrión de pollo". Pub. en la *Revista de Sanidad e Higiene Pública*. Madrid, 1944, año XVIII, núm. IV.
19. "Nuevas orientaciones en parálisis infantil". Publicaciones de *Galicia Clínica*. Madrid, 1944.
20. "Poliomiélitis experimental". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1944, tomo XXXVI.
21. *Nuevas adquisiciones sobre poliomiélitis*. Madrid, 1945.
22. "Adaptación del virus SK de poliomiélitis de lirón (*Myoxus glis*)". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1946, tomo XXXVIII.
23. "Estudio de la presencia de virus poliomiélico en los músculos de ratones inoculados con virus SK en el período preparalítico de la enfermedad". Publicado en *Cirugía del Aparato Locomotor*. Madrid, 1948, vol. 5.º, fasc. 3.º.
24. "Modernas orientaciones en el tratamiento de los procesos neoformativos del sistema linfoide". Publicado en *Medicamenta*. Madrid, 1948.
25. "Producción experimental de sarcoma en el ratón por la simple inyección subcutánea de una benzil-amino--estiril-quinoleína". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1948, tomo XLI.
26. "Ensayo de cultivo del virus poliomiélico en membrana vitelina". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1948, tomo XLI.
27. "Métodos químicos para la purificación y concentración del virus de la poliomiélitis". *Trab. Inst. Cajal*. Madrid, 1948, tomo XLI.
28. "Degeneración hepatolenticular (enfermedad de Wilson) de forma aguda: estudio clínico y anatomopatológico". *Rev. Clínica Española*, 4, 44, 102; año 1952.