

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

DISCURSO INAUGURAL

DEL CURSO 1962-1963

LEIDO EN LA SESION CELEBRADA EL DIA 21 DE NOVIEMBRE DE 1962

POR EL ACADEMICO NUMERARIO

EXCMO. SR. D. JULIAN SANZ IBAÑEZ



M A D R I D

DOMICILIO DE LA ACADEMIA:

VALVERDE, 22. — TELEFONO 221-25-29

1 9 6 2

Depósito Legal M. 15.097.-1962

C. BERMEJO, IMPRESOR.—J. GARCÍA MORATO, 122. — TELÉF. 233-06-19.—MADRID

LA NUEVA CITOLOGIA

EXCMOS. SRES. ACADÉMICOS :

SRAS., SRES. :

El vertiginoso desarrollo de las ciencias biológicas en estos últimos años, por la acción conjunta de biólogos, físicos, químicos y matemáticos en un intenso y profundo trabajo por aclarar los procesos biológicos, proporciona numerosos, variados y apasionantes temas para elegir en la disertación de apertura de Curso de esta Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, ante los que no resulta fácil decidirse por uno u otro. El que este año corresponda el discurso inaugural a la Sección de Naturales de esta Real Academia, justifica que ocupe esta tribuna para exponer un tema de biología, cual es «La nueva citología», que trataré de hacer lo más sucinta y claramente posible, aunque sea a costa de concretarme a aquellos puntos que considero más interesantes y demostrativos.

TEORÍA CELULAR

La teoría celular ha contribuido extraordinariamente al concepto actual de la biología al atribuir a todos los seres vivos una misma unidad de composición. Esta noción que hoy día parece evidente, tanto para el reino animal como vegetal, fue en un prin-

cipio muy combatida por ir en contra de los conceptos sobre la vida entonces en boga.

El término de célula proviene del micrografo, físico, médico, ingeniero y arquitecto inglés Hooke (1665), quien denominó células a los alveolos de la corteza y relacionó esta estructura con las propiedades físicas de la misma. No obstante esta valiosa primera observación, interesaba más a Hooke el instrumento, un microscopio compuesto por él construido, que el resultado de sus observaciones. Otro notable observador del siglo XVII, es Leeuwenhoek que trabajaba con lupas, por él construídas con suma habilidad, montadas en un soporte, lo que permitía enfocar bien los objetos. Estudió gran número de elementos anatómicos vegetales y animales, destacando entre ellos los glóbulos sanguíneos y los espermatozoides.

El microscopio compuesto, inventado a finales del siglo XVI por Zacarías Jansen, era un instrumento muy defectuoso porque las aberraciones de esfericidad y cromática de sus lentes proporcionaban imágenes distorsionadas y caprichosamente irisadas. No es extraño que con todos estos defectos los biólogos del siglo XVII pusiesen en cuarentena las descripciones hechas por estos notables micrografos. Ahora bien, lo que el instrumento tenía de malo técnicamente, lo tenía de bueno y atractivo en la alta sociedad, en la que llegó a estar de moda ya en el siglo XVIII, mirar por el microscopio.

El mes de diciembre de 1671 es notable en la historia de la teoría celular por dos comunicaciones presentadas en la Real Sociedad de Londres. En una Grew informó sobre la presencia de vesículas en la epidermis y parénquima de las plantas adultas y, en la otra Malpighi, de Bolonia, trató de la presencia de utriculus y saculus en la corteza de los árboles.

A finales del siglo XVIII Gallini y Ackermann afirmaron que los animales estaban constituidos por células limitadas por membranas, afirmación que pasó completamente desapercibida por no encontrar eco alguno entre los naturalistas de la época.

Las escuelas filosóficas aportaron también sus conceptos de constitución de la materia, y así vemos que en 1749 Buffon espe-

cula sobre la existencia en los animales y plantas de estructuras comunes y Oken considera que los organismos estaban constituidos por partes elementales aglomeradas, que podían hacerse independientes.

Ya en el siglo XIX Dutrochet vió en la célula una unidad anatómica y fisiológica.

Como tantas veces, la técnica contribuye con el perfeccionamiento de los instrumentos al mejor conocimiento de las estructuras. La fabricación de lentes acromáticas por Van Deyl en 1807 y la de objetivos acromáticos en los que estaba corregida la aberración de esfericidad por Fraunhofer, proporcionaron microscopios compuestos, que facilitaron extraordinariamente la observación precisa de las estructuras microscópicas. De esta época data el descubrimiento del núcleo de las células vegetales, por Brown 1835 y el de las animales por Purkinje y Raschkow, quienes la denominaron «guttula globosa» y Valentín «nucleus». En esta época aparece el tratado de Fisiología vegetal de Raspail, personalidad compleja, mezcla de político, médico, naturalista y revolucionario, en el que defiende que los organismos están constituidos por células. Purkinje, el gran investigador checo, además de sus excelentes aportaciones a la histología, como son las descripciones de las células del cerebelo que llevan su nombre y las células de Purkinje del corazón, dio a conocer su notable *Körnchentheorie*, según la cual el organismo no está constituido por cavidades, sino por esféculas o granos con sus núcleos. Llegamos ya al año 1838 en el que aparece el trabajo del botánico Schleiden sobre Fitogenia, en el que apoyándose en los hechos antes relatados y en otros más, funda la teoría celular, que le proporciona una celebridad que no guarda relación con el valor intrínseco del trabajo. Según Schleiden el núcleo o citoblasto es la primera condensación del líquido, que contiene azúcar, goma y moco, que se encuentra en la célula madre. En el mismo año aparece una serie de artículos de Schwann, asistente del famoso J. Muller, ilustre anatómico fisiólogo y patólogo que contribuyó a la formación de hombres tan ilustres como Reichert, Virchow, Du Bois-Reymond y Remak, en los que junto a valiosos datos cito e histológicos establece la constitución celular.

de los organismos y la identidad de estructura entre animales y vegetales. Esta idea, que contribuyó a su fama, hizo olvidar sus errores en lo que se refiere a la formación de las células. Es curioso que después de este trabajo no publicase más que un solo trabajo original sobre la bilis, en sus 50 años de profesor en la Universidad de Lovaina primero y Lieja después, sin tratar nunca más de la teoría celular.

En años posteriores se perfila la teoría celular, estableciéndose ya que las células están compuestas por esférulas nucleadas con una zona sólida alrededor del núcleo, que según Purkinje se hará cavitaria por la penetración de líquido. A esta materia viva primordial de las células animales la denominó Purkinje en 1839, *protoplasma*. Parece ser que la palabra protoplasma la tomó Purkinje, antiguo seminarista, del término teológico *protoplasta* que en la liturgia católica sirve para designar a Adán o primer hombre. Otra aportación importante fue la de Virchow, al establecer su patología celular y que toda célula procede de otra célula, «*omnis celula e celula*». Con esto, tenemos bien establecido, en la segunda mitad del siglo XIX, el concepto de célula con sus tres componentes: membrana, protoplasma y núcleo, así como el principio «*omnis celula e celula*».

A partir de este momento fue extraordinaria la aportación de los citólogos al conocimiento de la célula, tratando siempre de relacionar la estructura con la función. El acopio de hechos aumentaba de día en día. De entonces datan las descripciones acabadas de los organitos del citoplasma, mitocondrias, aparato de Golgi, centriolos, etc., y del núcleo. Se sientan las bases de procesos tan importantes como la fecundación, mitosis, meiosis y diferenciación celular, tratando siempre de comprobar si las estructuras que se veían en los preparados histológicos, realizados con arreglo a las técnicas clásicas, eran reales o artefactos producidos por la acción de los fijadores principalmente. En una primera época, finales del pasado siglo y primeros años del actual, las observaciones se hacían con gran frecuencia en fresco, previa disociación del tejido. Después fueron cada vez más frecuentes las coloraciones e impregnaciones metálicas, en estas últimas tienen lugar preferente

las de la escuela histológica española fundada por Cajal, llegándose a un momento en que no se podía avanzar más por haberse agotado todas las posibilidades técnicas. Merece destacarse, por lo curioso, el que las observaciones en fresco de la primera época que nos ocupa, están más cerca de lo que se ve en el microscopio electrónico, que los de la segunda, salvo algunas excepciones como son por ejemplo las mitocondrias.

Una tercera época la podemos fijar en 1930 al aislar los organitos y partículas citoplásmicos y el núcleo para determinar la composición química de los mismos por la aplicación de los diversos métodos físicos y químicos que disponemos. Si se medita sobre la pequeñísima masa de las células, del orden 10^{-9} gr. en húmedo y de 2×10^{-10} gr. en seco se comprende las dificultades de su determinación analítica. Ya no importan, para determinados trabajos, la integridad de la célula; se entra de lleno en la citología submicroscópica, en la que si en algún momento se olvidó de la morfología, pronto vuelve a ella para tratar de localizar los procesos descubiertos en las estructuras en que se realizan.

Se trata de tender un puente que cubra el abismo que separaba a biólogos y bioquímicos. Los nuevos hallazgos en virus y macromoléculas han salvado esta distancia al proporcionar a los primeros como objeto de estudio, las partículas de virus, como elementos pequeños adhesivos y a los últimos las macromoléculas de los ácidos nucleínicos.

Los nuevos hallazgos llevan consigo la necesidad de crear de nominaciones que expresen su significación, y así tenemos ahora los nuevos términos de *biología cristalina*, *biología molecular*, *moléculas infecciosas*, *herencia infecciosa* y *enfermedades moleculares*, que corresponde a uno o varios descubrimientos. En las ciencias biológicas hay cuatro términos mágicos (Horsfall) que son ácidos nucleínicos, genética, inmunología y virus. Los primeros, con las características que luego mencionaremos, son los responsables de la continuidad de la vida. La genética se ocupa de la herencia y su variación. La inmunología de las respuestas del huésped a mínimas diferencias en la estructura química, respuestas inmunológicas que son tanto más finas cuanto mejor distinguen en-

tre lo «propio y lo ajeno», «Self and non-self» de Burner, que no es otra cosa que discriminar las diferencias en la fina estructura química de las sustancias, cuya síntesis está bajo el control de los genes y, por último, los virus que tienen una constitución más simple y algunos de ellos carácter infeccioso, que ha dado lugar a la ahora denominada herencia de caracteres adquiridos. Los virus se consideran como vehículos para la transmisión de información genética al incorporarse al genoma de las células huésped, que se altera al recibir el nuevo material genético. Estos ejemplos explican el inesperado agrupamiento de disciplinas que hace poco parecía tenían poco en común e incluso eran consideradas como completamente distintas. En realidad se trata de la concurrencia para aclarar un determinado problema, por lo general muy complejo, con todos los medios que el hombre dispone para atacarlo. La moderna biología aparece asociada con las ciencias físicas y matemáticas, y sus perspectivas son tan amplias y atractivas como las de la física moderna o la astronáutica.

Los descubrimientos de La Gue y de Bye sobre la difracción de los Rayos X y la aplicación de las técnicas de difracción al estudio de las estructuras biológicas hecha por Herzog, hace poco más de seis lustros, han iniciado un extraordinario avance en el conocimiento de las estructuras macromoleculares de los componentes de los tejidos y contribuido a aclarar la estructura intramolecular de las proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleínicos y otras sustancias complejas. •

Los criterios morfológicos clásicos han sido rebasados y lo que antes eran sólo granulaciones o partículas sin estructura, como la mitocondrias, se han transformado en estructuras bien organizadas, con dispositivos morfológicos claros, en los que es posible localizar con precisión determinados sistemas enzimáticos.

Pasando a estructuras citológicas más pequeñas tenemos el microcosmos protoplásmicos de las partículas, que al aislarse y determinarse su composición y actividad química, han señalado mor-

fológicamente los sitios de la célula productores de energía, así como el lugar de las biosíntesis citoplásmicas. Todo este nuevo, difícil y complejo mundo de lo ultramicroscópico, se resume en la citología analítica que requiere el concurso de físicos, químicos, bioquímicos, biofísicos, biólogos y morfólogos, para resolver el problema de la vida celular.

La morfología detallada de los componentes celulares y el análisis de su composición química, parece haber limitado la significación biológica, pero ha hecho falta mucha paciencia, esfuerzo y precisión para resolver los complejos problemas que llevan consigo. Es indudable que estos hallazgos proporcionan la base de una próxima etapa, en la que será fácil establecer la relación de la función fisiológica con la interacción de los grupos químicos y diferentes componentes de los sistemas protoplásmicos. La regulación de la actividad de un gene por otro, el control genético de la síntesis de los enzimas ; el control recíproco de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, así como los mecanismos de realimentación en los sistemas enzimáticos, son problemas que cada vez se conocen y precisan mejor.

En otra etapa, más avanzada, se estudiarán los mecanismos que regulan la automatización de los procesos biológicos en un orden determinado.

La construcción de relojes biológicos para determinar la regulación temporal de los procesos biológicos son nuevas rutas en la investigación citológica en particular y la biológica en general.

De los cuatro grandes instrumentos que emplea la óptica física, el microscopio, espectroscopio, la cámara y el telescopio, los citólogos emplean para sus estudios los tres primeros. Indudablemente el microscopio destaca entre los tres, tanto por su historia como por el gran papel que juega actualmente en su versión electrónica, en morfobiología.

La microscopía electrónica ha proporcionado en 15 años tal número de hechos, sobre todo en citología, que es necesaria una revisión de la misma y nos atrevemos a decir que incluso exige, en parte, el olvido de la citología y la histología clásica para conocer bien la nueva.

Pasemos revista, aunque sea rápidamente, a las aportaciones proporcionadas por la aplicación de nuevos métodos al estudio de la célula.

CITOESPECTROFOTOMETRÍA

Los métodos de preparación del material para los estudios citofotométricos es distinto del que se emplea en la citología clásica, por ser también diferentes las circunstancias y características que deben reunir el material en uno y otro método. En la morfocitología se fijan las estructuras y son tanto mejores los fijadores cuanto menos modificaciones producen en las células. Además, es corriente el empleo de colorantes e impregnaciones metálicas para aumentar el contraste entre las diferentes partes de las células o tejidos. En el análisis fotométrico no interesan estas circunstancias; lo importante es que el fijador no coloree el tejido, aunque se tiña intencionadamente para que puedan realizarse extracciones químicas o digestiones del mismo, y, por último, reducir al mínimo las diferencias de los índices de refracción de los elementos de la célula o tejido. Es obvio que para reunir estos requisitos hay que sacrificar la morfología celular, y así vemos que en el método para el estudio de las núcleoproteínas, la fijación en alcohol acético destruye las mitocondrias, la cromatina aparece como grumos, en lugar de aparecer dispersada por todo el núcleo, y se pierde gran cantidad de granos de cimógeno. El proceder mejor para llenar las exigencias de la morfología y las del análisis de las núcleoproteínas, es congelar los tejidos a la temperatura del nitrógeno líquido, fijar en etanol y después desecar. Con este proceder la fijación del material es excelente y pueden probarse en él todas las tinciones y pruebas de extracción y digestión de las técnicas para núcleoproteínas. Hay que advertir que la fijación es óptima sólo para las núcleoproteínas y aquellas sustancias que se alteran por el alcohol, por no disolverse en los procesos de hidratación, coloración, etc. Otras sustancias, por el contrario, como los lípidos, pueden desaparecer con esta fijación.

En la citología clásica hace falta dominio de la técnica y gran

experiencia observadora para poder enjuiciar acertadamente lo que se ve. Desde el punto de vista del fundamento químico de las coloraciones e impregnaciones metálicas, sabemos realmente poco, a pesar de los detenidos estudios que se han hecho.

En las medidas fotométricas de los preparados histológicos el mayor inconveniente es que hay que crear métodos que puedan ser empleados en rutina y proporcionen resultados reproducibles en manos de cualquier investigador que guarde todos los requisitos en su realización.

La morfología clásica reconstruía el proceso morfológico después de haber estudiado las células en fases sucesivas del mismo en distintos preparados. El resultado final, en realidad, era un valor medio correspondiente a células que tenían aparentemente el mismo aspecto.

De todas las técnicas que emplea la citología analítica es quizá el análisis cuantitativo de absorción con el espectroglicina, el que más se usa, por darnos la posibilidad de expresar en valores objetivos las diferencias del color natural o de las tinciones y pruebas que se emplean por los cito e histoquímicos para la localización de las sustancias en las células. Las comparaciones visuales tienen un valor muy limitado para resolver las cuestiones en las que están afectadas las variaciones de la concentración y volumen celular, pero donde las condiciones químicas y físicas son favorables, el análisis de absorción permite, sin dificultad, obtener datos de los que puede calcularse la cantidad relativa de sustancias absorbentes, en una gran variedad de concentraciones.

Swift determinó el ácido nucleínico en el DNA en núcleos esféricos, en los que había diferencias de concentración del mismo, entre las más altas y bajas, del orden de veinte. Esto ha sido posible con el microespectrofotómetro, aparato hoy indispensable en todo laboratorio que se ocupa de la cito e histología normal o patológica.

Otro punto de gran importancia es el papel que juega la microespectrofotometría visible en los estudios fisiológicos y bioquímicos que tratan de localizar en las células los componentes químicos y su relación con las funciones celulares. Con frecuencia

estos estudios tropiezan con el inconveniente de que el gran número de células de la muestra dificulta la determinación del valor medio de estos componentes en las células. Un ejemplo aclarará esta dificultad. Si los bioquímicos tratan de determinar el valor medio del núcleo de diferentes tejidos de un animal, encontramos que coinciden en que la cantidad de DNA es la misma. Este dato se interpretó en el sentido de que era constante la cantidad de DNA de cada núcleo, conclusión a todas luces incorrecta porque en la muestra analizada había algunos millones de núcleos, algunos de los cuales podrían contener poco o nada DNA. La microespectrofotometría de núcleos aislados demuestra que estos contienen poco DNA, del orden del 10 al 15 %, en marcado contraste con la gran cantidad de proteína, que puede variar en una magnitud una o dos veces mayor.

En el futuro la microespectrofotometría podrá aclarar muchos problemas de las complejas uniones de las sustancias celulares y proporcionar preciosos datos sobre el grado de polimerización, naturaleza y extensión de las nucleoproteínas, de ácido ribonucleínico o el número y tipos de grupos libres, ácidos o básicos, de una gran molécula.

CITOMETRÍA ULTRAVIOLETA

La primera vez que se empleó con éxito el análisis fotométrico en histología fue en el estudio de la absorción ultravioleta natural por los ácidos nucleínicos y proteínas. Caspersson, empleó el método fotográfico con un iluminador monocromático y un microscopio con óptica de cuarzo, para obtener curvas de absorción de la cromatina del núcleo celular. Por la forma de la curva pudo demostrar que la marcada absorción ultravioleta de la masa nuclear, conocida desde la primera aplicación del microscopio de cuarzo en 1904, era debida, probablemente, a su contenido en ácido nucleínico.

Este hallazgo está en relación con lo que ya se sabía de la cromatina, que por definición es la sustancia del núcleo que se tiñe con los colorantes básicos, por la basofilia de los ácidos nucleí-

nicos. El descubrimiento de Caspersson no fue tomado en consideración por otros contemporáneos suyos, como Wyckof y Ebeling, que se ocupan también de la microscopía ultravioleta. Los discípulos de Caspersson han seguido trabajando con técnica ultravioleta y, después de varios perfeccionamientos de la misma, han proporcionado valiosos datos acerca de la localización y metabolismo de las núcleoproteínas en las células e influenciado en la orientación de las investigaciones de bioquímicos, fisiólogos y citólogos.

El estudio citométrico de Caspersson fue un análisis cualitativo, en el que se sirvió de la forma de la curva de absorción de la luz ultravioleta, para determinar la distribución de los ácidos nucleínicos y proteínas y la proporción de aminoácidos básicos y ácidos. El método no discriminaba los dos principales tipos de ácido nucleínico, desoxipentosa y pentosa, si bien teóricamente se admitiese que estaban distribuidos distintamente en la célula, predominando el DNA en la cromatina.

La microespectrofotometría visible, además de lo indicado antes, puede emplearse en citología, para la comparación objetiva de pruebas y coloraciones, para la estimación química de los componentes de cada célula y para aclarar la naturaleza de los complejos químicos intracelulares y estructura molecular, por medio del análisis de las curvas de absorción.

El mayor esfuerzo en la citología, con microespectrografía visible, ha sido elaborar un método de absorción cuantitativo, de una pequeña región de célula o tejido, con objeto de completar los resultados del análisis bioquímico de órganos y tejidos y granitos celulares, tratando de tender un puente que cubra la separación entre los hallazgos de la citología fotométrica y los morfológicos.

La reacción de Millon, realizada por éste en colaboración con un bioquímico, tuvo, en principio, dos finalidades: una, determinar la pérdida de proteína durante el aislamiento de núcleos celulares para el análisis clínico; otra, sustituir una prueba de extracción diferencial de histona y proteína para el método ultravioleta de Caspersson, por una determinación de histona, que según han demostrado Misky y Collister, no tienen base química.

El análisis citofotométrico, con la reacción de Millon, de núcleos fijados de manera que no perdiesen las proteínas, se comparó con la composición de los núcleos de los cortes de tejidos fijados después de haber sido lavados con solución salina fisiológica, como se hace en el método del ácido cítrico para el aislamiento de núcleos, comprobándose que en este último proceder había una pérdida de proteínas de un 75 por 100.

Los resultados obtenidos con la reacción de Millon coinciden, en general, con los referidos por Caspersson y colaboradores, cuando emplearon las curvas de absorción de ultravioleta para determinar las nucleoproteínas nucleares. Estos hechos han dado lugar a que Collister y Leuchtenberguer hallan llegado a la conclusión que el núcleo, que durante mucho tiempo se ha caracterizado por su basofilia y reacción nuclear como el sitio preferente y de mayor localización intracelular del ácido nucleínico, contiene una concentración de proteína muy alta, comparable a la del citoplasma.

Las técnicas de absorción visible aplicadas a los estudios celulares han dado un brillante resultado con los estudios cuantitativos con la relación de Feulgen para el ácido nucleínico desosipentosa. Aquí existente amplios puntos de contacto entre la citometría y el análisis bioquímico. El hecho más convincente es que unas veces han sido proporcionados los hechos, primero por los bioquímicos y otras por los citometristas, como es el caso de la relación 1 : 1, entre el contenido medio de DNA y el número de cromosomas, proporcionado por los primeros, y el descubrimiento de que la síntesis de DNA tiene lugar en la interfase, proporcionado por la citometría.

Empíricamente se ha demostrado que la reacción de Feulgen puede usarse actualmente para estimaciones relativamente cuantitativas de DNA en tejidos de un animal y muy posiblemente en el mismo tejido de distintas variedades de animales. En otras palabras, el valor k para el DNA de la reacción de Feulgen, permanece constante en la nucleoproteína en una amplia variedad de núcleos, lo que permite una estimación relativa de su cantidad y concentraciones. Este resultado anima a continuar el esfuerzo

por conseguir métodos empíricos para la apreciación de otros grupos químicos celulares y procurar aparatos, técnicas y análisis fotométricos que permitan precisar las variaciones biológicas celulares a niveles relativamente bajos.

Muy recientemente se ha comenzado a usar la citofotometría en el espectro visible, para el estudio de los complejos químicos intracelulares y de la estructura molecular. La reacción del ácido peryódico de Schiff se ha estudiado en una gran número de polisacáridos de células y tejidos, comparando las curvas de absorción con los modelos de sustancias extraídas. Las curvas de absorción de los polisacáridos esterificados (con sulfato de condroitina), están muy influenciadas por las proteínas asociadas, en contraste con las de polisacáridos, que son muy semejantes a las de los modelos con sustancias puras.

MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES

Se debe al físico holandés Zernike el desarrollo de la teoría y práctica del método de microscopía con contraste de fases. En un principio interesó a los telescopistas, no manifestando mucho entusiasmo los biólogos. Realmente la mejor aportación a la citología de esta técnica ha sido la de comprobar en material vivo las estructuras que ya se conocían por el microscopio de luz aplicando, como es natural, las técnicas de fijación corrientes en la técnica microscópica usual.

Sin la realización del microscopio electrónico es fácil que la microscopía de fases hubiese sido más empleada; no obstante, tiene sus aplicaciones, en lo que se refiere, como ya hemos indicado, al estudio de las células y tejidos vivos.

MICROSCOPIA DE INTERFERENCIA

La interferencia, empleada durante muchos años para medir el índice de refracción de las sustancias, particularmente líquidos y gases, es un método de gran sensibilidad y seguridad.

Sorprende que no se hayan empleado los métodos interferométricos en el trabajo microscópico. Si bien hace años que se conoce la microscopía por interferencia, es recientemente cuando se han conseguido instrumentos muy perfectos que permiten observaciones precisas.

Ambrose y colaboradores, del Instituto de Investigaciones «Chester Beatty», son de los que más han contribuido al desarrollo de técnicas apropiadas para la observación con este tipo de microscopio y proporcionado gran número de datos hasta ahora desconocidos.

Davies ha revisado los distintos métodos que existen para el empleo del microscopio de interferencia en la medida de masas secas en las células vivas. Michitson, Passano y Smith, han perfeccionado el método de interacción óptica con un sistema de registro, consiguiendo excelentes resultados en el estudio de una sola célula en crecimiento de la levadura *Schizosaccharomyces Pombe*. La técnica por estos autores desarrollada tiene el inconveniente de que no puede usarse cuando las células producen una retardación de la fase en su imagen de interferencia mayor de 0,15 gamas. Recientemente, Ambrose y Bajer, han dado a conocer un nuevo método, por el que se puede hacer un registro continuo en la masa seca y concentración de varios constituyentes de una célula durante el ciclo mitótico.

En sus experimentos han empleado el endospermo de la planta *Leucojum aestiveum* L. En las condiciones experimentales en que se realizó el estudio pudieron comprobar, que durante la profase aparece una zona clara alrededor del núcleo. Esta zona se desarrolla al principio muy lentamente, y en una segunda etapa su formación es bastante rápida (de veinte a cuarenta minutos). Cuando la zona clara está bien formada, tiene lugar la ruptura de la membrana nuclear, el desarrollo del huso y la formación de la placa metafásica. Hacia el final de la anafase comienza a aparecer una región interzonal entre los dos juegos de cromosomas, formándose un fragmaplasto, y, por último, los dos núcleos hijos.

Los cromosomas juegan un importante papel en la formación de la zona clara. En algunos grupos se han observado protusiones

en el citoplasma y que la zona clara se formaba alrededor de éstas. Las dimensiones de la zona clara, así formada, dependen del material cromosomal de la protusión. Durante la segunda fase de la formación de la zona clara, disminuye el volumen del 5 al 10 por 100, lo que hace pensar que el material nuclear contribuye también a su formación. Por el microscopio de interferencias se ha demostrado que la masa seca por unidad de superficie de los cromosomas aumenta progresivamente durante la profase hasta la segunda fase de la formación de la zona clara. Cuando ésta está bien desarrollada, la masa seca por unidad superficial de los cromosomas disminuye considerablemente, aunque los cromosomas estén ligeramente contraídos en longitud y aumentados en diámetro. Esto indica que los cromosomas *segregan* algún material que puede contribuir a la formación de la zona clara y posiblemente a la del huso.

Otra aplicación de la microscopia de interferencia ha sido para estudiar el mecanismo de los movimientos de las células en la formación de los tejidos durante el crecimiento y desarrollo. Las investigaciones de Ambrose y Eati han hecho posible registrar cinematográficamente, con el microscopio de interferencias, los mecanismos de locomoción, principalmente dos. El primero, conocido como movimiento ameboide, se inicia por una expansión, en forma de pseudopodo, en el extremo principal de la célula, al que fluye el citoplasma posteriormente. La expansión de la membrana va acompañada de un proceso de contracción localizado en la extremidad posterior de la célula o ameba, en el caso de que se realiza la investigación en ésta. El movimiento es muy probable se deba a un exceso de presión momentáneo del extremo principal de la célula.

En el mecanismo segundo de locomoción, no son necesarios la expansión de la membrana y el fluir del citoplasma. El movimiento se produce por ondulación de la membrana en una gran parte de la superficie celular. En las películas en color, tomadas con el microscopio de interferencia, las ondulaciones parecen marchar desde el extremo principal de la célula hacia el núcleo. En los estudios realizados con fibroblastos y células epiteliales de

mamíferos, se han podido comprobar también ondulaciones similares de la membrana celular. Merece destacarse el hecho, ya conocido en histología e histopatología, de que las células se unen y desunen frecuentemente.

Al establecerse el contacto entre dos células tiene lugar una adhesión en el punto de contacto de las membranas ; cesa la ondulación del extremo principal de la célula y queda fijada, aunque sea temporalmente, la unión de ambas células. A estas dos células pueden unirse otras que presenten ondulaciones en su membrana. Cuando la célula se mueve en la misma dirección se originan tensiones en el punto de contacto de las células, que, a veces, son lo bastante fuertes para romper la adhesión entre ellas. El desarrollo del tejido y el número de contacto entre las células aumenta hasta un momento en que cesan los movimientos de las membranas y se hace estable la adhesión entre las células. Se ha estudiado también en los tumores, concretamente en el sarcoma, el movimiento de las células tumorales y comprobado que existe una diferencia entre ellas y las células conjuntivas de las que derivan, que consiste en que estas últimas son capaces de emigrar por movimientos ameboides y ondulatorios, pero sin que las adhesiones entre las células sean estables. Además, los fibroblastos normales son capaces de moverse libremente sobre la superficie de las células tumorales sin que se produzcan adhesiones entre ellas. Estos hechos indican que en la transformación de una célula normal en tumoral tiene lugar una disminución de la adhesividad mutua de las membranas celulares.

Lo expuesto acerca de las células sarcomatosas se ha comprobado también en las de los tumores epiteliales.

Este importante hecho biológico ha dado lugar a una serie de trabajos encaminados a determinar, por métodos físico-químicos, las propiedades de las membranas. De esta manera se ha demostrado que la transformación tumoral de una célula va acompañada de un aumento de las cargas negativas superficiales y que corren paralelos el aumento de estas cargas de la célula con las propie-

dades anaplásicas de la misma. Además, conforme aumentan las cargas negativas disminuye la adhesibilidad de las células, que depende de una proteína globular del material intercelular.

MICROESPECTROSCOPIA CON LUZ ULTRAVIOLETA

La producción de las grandes casas de óptica de objetivos de cuarzo monocromáticos, así como el suministro de fuente de luz monocromática de ultravioleta de alta intensidad, dio lugar al desarrollo de técnicas apropiadas para el estudio de células y tejidos en material vivo o fijado, pero sin teñir, que presenta grandes ventajas sobre la microscopía de luz en los estudios de determinadas características de las células. Las primeras tentativas hechas para valorar críticamente la significación química de la absorción selectiva de luz monocromática ultravioleta en los tejidos tuvieron poco éxito. Aunque Smakula y Laser dieron a conocer que la absorción máxima en varios tejidos es de 260-280 m μ , el reconocimiento de la utilidad de estas técnicas de absorción se hizo cuando Caspersson publicó su monografía sobre este problema. Después ha ido creciendo constantemente, y hoy día constituye un cuerpo de doctrina perfectamente reconocido: la citoquímica de microabsorción cuantitativa, empleando la absorción de energía radiante no sólo en el medio ultravioleta, sino también en las frecuencias de infrarrojo, visible y rayos X.

CITOAUTORADIOGRAFÍA

El empleo cada vez mayor de los isótopos radioactivos en biología han encontrado también aplicación en los estudios citológicos, con el perfeccionamiento de las técnicas radioautográficas. Las células o tejidos que contiene un radioisótopo se colocan en contacto con una emulsión fotográfica, en las que las partículas del isótopo produce una imagen de la zona radioactiva del objeto. Después de revelada fotográficamente la emulsión, afectada por el

objeto radioactivo, puede examinarse directamente o con el microscopio de luz. El método hace posible relacionar la presencia o ausencia de un cuerpo marcado y las características normales o patológicas del material estudiado.

La aplicación de los isótopos radioactivos al estudio del metabolismo intermediario del organismo, por medio de sustancias marcadas con ellos, sintió pronto la necesidad de saber el sitio exacto en el que se fijaban dichas sustancias. La introducción en 1947 por Pelcke, en el año siguiente por Boy y Williams, del método de autoradiografía, permitió determinar con gran precisión en qué células y partes de ellas se localizaban los isótopos radioactivos. Muchas cuestiones de la localización del metabolismo en las estructuras se han solucionado con los autoradiogramas. Así tenemos en la escuela de Büchner que Oehlert ha estudiado el metabolismo proteico por la inyección de aminoácidos marcados radiativamente, sobre todo, con leucina marcada con tritium H-3, llegando al resultado que en determinadas clases de células existían en la misma intensidad los tres diferentes ácidos aminados, por él empleados. La presencia de estos ácidos aminados es especialmente intensa en aquellas células que sintetizan los fermentos digestivos de naturaleza proteica, como son las células principales de la mucosa del cuerpo del estómago.

Las células nerviosas toman en diferente cuantía los aminoácidos marcados con isótopos radioactivos; habiéndose podido demostrar que las distintas células nerviosas del cerebro tienen un metabolismo proteico de muy diversa intensidad. Las que lo tienen más intenso son las células de Purkinje del cerebelo y las ganglionares de la corteza cerebral, principalmente las del asta de Amon. Existe una correlación entre la intensidad con que fijan las células los ácidos aminados y su sensibilidad a la inhibición de la respiración celular. Büchner y colaboradores se han ocupado de este tema y obtenido resultados que coinciden con lo expuesto.

En el metabolismo del núcleo juega un importante papel el ácido ribonucleínico, como lo demuestra que el aporte de cistidina H-3, que es un componente del ácido ribonucleínico, se acumula se-

lectivamente en el nucleolo, del cual pasa al citoplasma y, por último, el nuevamente formado y todavía marcado ácido ribonucleínico pasa totalmente al citoplasma, no siendo ya demostrable en el nucleolo. Estas experiencias demuestran la exactitud de la observación de Cassperson obtenido por medio de la microscopía ultravioleta, según las cuales el RNA se forma en el núcleo, se condensa en el nucleolo y pasa después al citoplasma, en el que controla la síntesis proteica.

CITO E HISTOQUÍMICA

La Cito e Histoquímica es uno de los campos en los que actualmente se trabaja más, tanto en histología normal como patológica.

La histoquímica trata de identificar la localización intra o intercelular de algún componente químico, o la actividad enzimática característica de un determinado tejido. La mayor parte de las veces son estudios cualitativos y en pocos casos se intentan determinaciones cuantitativas con el empleo de pruebas y tinciones específicas. Así tenemos, la demostración de los mucopolisacáridos en las células glandulares, la de heparina en las células cebadas y la de la fosfatasa alcalina en el epitelio renal. Cuando estas sustancias son relativamente abundantes, la citofotometría es el procedimiento ideal para determinar su cantidad. Ahora bien, cuando están en muy pequeña proporción, entonces es necesario, para que puedan demostrarse microscópicamente, concentrarlas en pequeños granos.

Por lo general, a los histoquímicos no parecen interesarles aquellos componentes químicos de las células, que, por su cantidad, color y localización, atraen más la atención de los histólogos. Tal ocurre con los ácidos nucleínicos y proteínas. Esta circunstancia ha hecho decir a Gomori, buen conocedor de la histoquímica, a cuyo desarrollo ha contribuido extraordinariamente con sus trabajos y creación de nuevas técnicas, que la demostración de las sustancias proteicas no tiene una gran importancia en histoquímica por ser componentes unipresentes en todas las células.

Lo que interesa actualmente en la histoquímica son las determinaciones cuantitativas de los principales componentes del citoplasma. Uno de los que con Gomori y Pearse han contribuido más el desarrollo de la histoquímica es Lison, que trabaja actualmente casi exclusivamente con métodos citofotométricos.

A primera vista parece que debe existir una estrecha relación entre histoquímicos y analistas bioquímicos, porque unos y otros pueden aprovechar los hallazgos recíprocos para relacionar las localizaciones en las células realizadas por la histoquímica con los hallazgos de los análisis en homogeneatos de tejidos y órganos. La realidad es que entre los dos grupos hay muy poco contacto y que los histoquímicos confían sólo en sus resultados, preocupándose poco de los hallazgos que les proporcionan los químicos, hasta el punto de que es frecuente no encontrar en los trabajos de histoquímica dato alguno sobre la comprobación química analítica de dichas sustancias en el material estudiado.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

La estructura de la célula proporcionada por el microscopio electrónico es bastante diferente de la que hasta ahora se consideraba típica. Bien es verdad, que persistentes sus tres partes fundamentales : membrana, citoplasma y núcleo, pero tan cambiadas en su estructura íntima que hace necesario renovar la idea que de ella teníamos si queremos apoyar nuestras nuevas observaciones en los hechos recientemente adquiridos.

Aunque siempre ha dominado la citología el concepto dinámico de la estructura, tratando de relacionar forma y función, de la membrana se tenía una idea morfológica bastante rígida, al considerarla como una zona externa que limitaba y aislaba, a modo de muralla, o poco menos, el citoplasma y núcleo del exterior. La M. E. ha demostrado que la membrana no es una cubierta lisa, sino todo lo contrario, se invagina una y otra vez en el citoplasma, llegando incluso a poner en relación el medio exterior

con el núcleo, por lo menos con la membrana externa de éste. Además, el fenómeno de pinocitosis, por el que se establece un intercambio entre la célula y el exterior, es auténticamente un fenómeno de membrana.

En cuanto a la membrana nuclear se ha descubierto con la microscopía electrónica que no limita y reviste el núcleo de un modo continuo, sino que existen poros a través de los cuales se continúa el núcleoplasma con el citoplasma.

La estructura del citoplasma se ha aclarado extraordinariamente, y así vemos que se encuentra ocupada por un sistema canaliculo-vesicular, conocido como retículo endoplasmático, formado por canales y vesículas limitados por membranas, que contienen en su interior una sustancia endoplasmática. Entre el sistema canalicular hay una sustancia o matriz poco diferenciada. Adosados al retículo endoplasmático, existen unos granos de RNA, los ribosomas, que condicionan la basofilia del citoplasma y constituyen junto con el retículo endoplasmático, el ergastoplasma, ya denominado así por Garnier.

Por ser las mitocondrias las que mejor se conocen de los organitos citoplásmicos, nos limitaremos a glosar su estructura y función.

Desde que Benda, en 1902, las tiñó con violeta de cresilo, se ha admitido la presencia en el citoplasma de unos granitos denominados mitocondrias. Hasta los trabajos de Palade con el microscopio electrónico, se desconocía su fina estructura y que en la célula es el organito más importante del metabolismo celular. Morfológicamente presentan una doble membrana, que es lisa en su contorno externo, formando en el interno una serie de pliegues o crestas transversales, constituídas por dos capas de proteína, separadas por una doble capa de moléculas de lípidos. El número, forma y disposición de las crestas, como el de la mitocondrias, varía en las células de los distintos tejidos. Si importante fue el descubrimiento de la estructura, es mucho más el de su función. En las crestas mitocondriales se encuentran los sistemas polienzimáticos (Palade), que según las investigaciones realizadas por

los colaboradores de Büchner, v. Deimling, Möllert y Duspire, en las fibras musculares cardíacas, se distribuyen electivamente en las láminas de las mitocondrias, faltando en la membrana externa. Para Büchner, la inhibición de la aerobiosis de la célula muscular cardíaca, tiene lugar por la inhibición de la fosforilasa localizada en las mitocondrias. La demostración de la misma se ha hecho por v. Deimling, Molbert y Duspire, empleando fosfato-I glucosa, como sustrato, y plomo-II-ion, como revelador. La liberación del fosfato por la fosforilasa facilita la formación del fosfato de plomo, que se ve bien en el microscopio electrónico. La fosforilasa se encuentra en la capa externa de las crestas mitocondriales.

Por último, vamos a ocuparnos del núcleo, limitándonos a glosar algunos problemas muy de actualidad de los cromosomas, a cuyo conocimiento han contribuido sensacionalmente en estos últimos años, tanto los citogenetistas como los bioquímicos.

CROMOSOMAS HUMANOS

El desarrollo en estos últimos cinco años de las técnicas de cultivo de tejidos y de análisis citogenético por aplastamiento, permite trabajos en rutina del cario e idiograma humano.

Las células somáticas de los animales superiores son «diploides», por constar de dos series o juegos completos de cromosomas. Existen también células con números múltiplos de pares de cromosomas, las células poliploides, así como otras en las que el número de cromosomas no es múltiplo del diploide, conocidas como heteroploides, que son aneuploides cuando el número heteroploide de cromosomas varía en las distintas células somáticas.

Hasta hace poco no se ha determinado con exactitud el número de cromosomas de las células humanas, por haberse calcula-

do sólo estadísticamente de datos deducidos de la herencia. La visualización y recuento de los cromosomas realizados hoy con relativa facilidad, ha permitido a Tjio y Levan, en 1956, fijar en 46 el número de cromosomas somáticos del hombre, en lugar de 48 admitidos hasta entonces. Painter, en 1921, aunque propuso que el número de cromosomas de las células somáticas del hombre era de 48, insinuó ya que podría ser 46.

Los trabajos posteriores de Ford, Hamerton, Chu y Siles y otros citogenetistas, confirmaron el trabajo de Tjio y Levan, y demostraron que no había variaciones en el número y forma de los cromosomas de las células de los distintos órganos del cuerpo, excepto la diferencia entre los cromosomas X e Y. Por el cariotipo de una célula somática se pueden tipificar los cromosomas de un individuo o de una especie. Cuando los cromosomas se presentan diagramáticamente, ordenándolos por tamaños y tipos, se trata de un «idiograma». Al principio, cada citogenetista tenía su clasificación y era frecuente el confucionismo entre ellos. Para evitarlo, tuvo lugar una reunión de citogenetistas en Denver, en la que se fijaron las características cuantitativas de los cromosomas mitóticos humanos, estableciendo siete grupos, sirviéndose de tres parámetros para identificarlos : 1.º La relación de la longitud de un cromosoma a la longitud total de un juego haploide de cromosomas incluyendo el X, esto es, 22 autosomas más un cromosoma X ; 2.º la relación de la longitud del brazo más largo al más corto, midiendo los brazos desde el centrómero a los extremos del cromosoma, y 3.º la presencia de satélites. Por los centrómeros se clasifican los autosomas en mediano-meta y terminales o acrocéntricos. En el grupo primero, se incluyen los autosomas números 1-2-3, en el segundo, 4-5 y en el tercero del 6 al 12, inclusive ; a este grupo pertenece el cromosoma X ; en el cuarto, 13-14, en el quinto, 16-18 ; en el sexto, 19-20, y en el séptimo, 21-22. Los cromosomas X-Y son aparte.

Desde un punto de vista clínico, el estudio cariológico ha permitido separar cuadros clínicos como los síndromes de Turner o disgenesia gonadal con 45 cromosomas y XO de caracterización sexual ; el de Klinefelter, caracterizado por esterilidad, microorqui-

dia, ginecomastia, retardo mental y aumento de gonadotropinas en la orina. La cromatina sexual es positiva en los varones y los cromosomas son 47, con un componente sexual XXY. El síndrome de pseudohermafroditismo masculino con testículos feminizantes, con cariotipo 46/XY cromosomas, por lo que genéticamente son masculinos. Otra forma de deficiencia mental es el mongolismo, con cariotipo con 47 cromosomas por trisomía del número 21. Por último, mencionaremos el síndrome Morgan o distrofia mesodermal, en que si bien el número de autosomas es normal, se aprecian en el cariotipo numerosos satélites.

CROMATINA SEXUAL

La cromatina sexual es un signo característico de los núcleos femeninos en interfase en los seres humanos y en algunos animales. Es raramente visible en las células masculinas. La cromatina sexual permite establecer el dimorfismo sexual de los núcleos en dichas especies. La cromatina sexual es un corpúsculo plano convexo, situado junto a la membrana nuclear. Algunas veces aparece en forma de acúmulo redondo o angular y rodeado de un halo claro, que lo hace más conspicuo. A veces hay varios y otras no se ve en todas las células pertenecientes al sexo femenino.

Fue descrito por primera vez en 1949 por Barr y Bertrán, de Londres, en las neuronas motoras del núcleo hipoglosó del gato. Posteriormente se ha demostrado el dimorfismo sexual del núcleo en las células de diversos tejidos de 41 mamíferos. Hoy día, se emplea para su demostración la biopsia de la piel, descrita por Moore, Graham y Barr, en 1953; la mucosa bucal y los leucocitos neutrófilos.

La cromatina sexual o corpúsculo de Barr había sido visto antes por los citólogos, pero no habían relacionado su presencia con carácter sexual alguno. En 1909 Cajal describió con gran detalle el núcleo de las células nerviosas de varios mamíferos, mencionando la presencia en el núcleo de una masa perinucleolar, que denominó corpúsculo basófilo, el cual sólo era visible algunas

veces en el nucleoplasma. En otros casos, el corpúsculo de Barr está enmascarado por gruesos gránulos de cromatina en los núcleos de ambos sexos, por lo que no es posible establecer el dimorfismo sexual de los núcleos.

La aplicación diagnóstica de la cromatina sexual ha sido empírica, hasta que se ha desarrollado y perfeccionado el cario e idiograma. A partir de 1959 se han realizado estudios con objeto de relacionar la cromatina sexual, fácil de demostrar, con los cromosomas sexuales. El resultado de estos estudios es, que es posible establecer una relación entre ambos cuando en el cariograma hay más de dos cromosomas X.

Como regla general tenemos que, el número de cromosomas X es uno más que el de corpúsculos de Barr en las mismas células, esto es, a un nódulo de Barr corresponden en el cariograma complejos cromosómicos sexuales XX, XXY, XXYY, XO. A células con dos corpúsculos de cromatina sexual, cariogramas de XXX, XXXY, y al de tres nódulos cuatro cromosomas X. Esta relación entre el número de nódulos de Barr y el de cromosomas X aboga en favor de que los cromosomas extra son cromosomas X, y que la cromatina sexual representa un cromosoma X sencillo, con heteropicnosis positiva.

CITOLOGÍA MOLECULAR

Un hecho trascendental fue la demostración de la actividad biológica de los ácidos nucleínicos, más concretamente la del DNA.

Basándose en el trabajo de Heidelberge sobre los polisacáridos capsulares de los diferentes tipos de neumococo, Avery MacLeo y Mc Carti (1944), consiguieron la formación de cápsulas en un neumococo rugoso con ácidos desoxiribonucleínicos DNA, de un tipo capsulado heterólogo. En estos experimentos, el DNA altamente polimerizado de un neumococo capsulado tipo III, añadido a un cultivo en pleno crecimiento de neumoco tipo II no capsulado, inducía la formación de neumococos capsulados de tipo III. En los neumococos transformados se introducía a un nuevo ciclo

metabólico por la acción del DNA adicionado, que conducía a la formación de polisacáridos capsulares tipo III.

La posibilidad de transformación de un tipo de neumococo en otro, ha hecho posible modificar y transformar la resistencia a los antibióticos de los diferentes neumococos. La ampliación a otros gérmenes de estos resultados ha abierto nuevas posibilidades en la terapéutica antibiótica y quimioterápica.

En los últimos años ha tenido lugar un gran avance en el conocimiento del importante papel que juegan los ácidos nucleínicos en la biología de las células vivas. Ahora está completamente claro el control que ejercen en muchos procesos fundamentales de la vida.

Los ácidos nucleínicos están formados por nucleótidos, cada uno de los cuales están formados de una base púrica o pirimídica, un azúcar pentosa y un grupo fosfato. Algunas veces se refieren a los monofosfatos nucleótidos, siendo un nucleósido el producto de condensación de una pentosa y una base. En el ácido ribonucleínico (RNA), el azúcar es la ribosa, y las bases principales : Adenina (A), Guanina (G), Citoxina (C) y Uracilo (U) ; los nucleótidos que lo forman están unidos uno a otro por uniones de fosfato, que unen el átomo de carbón 5 del azúcar de un nucleótido al átomo de carbón 3 del azúcar del nucleótido siguiente en la secuencia.

El ácido desoxiribonucleínico (DNA) está compuesto por nucleótidos unidos similarmente por ésteres de fosfatos ; el azúcar es de 2-desoxiribosa y las bases principales son adenina, guanina, citosina y timina. El DNA consta de dos cadenas de polinucleótidos unida una a otra por uniones de hidrógeno entre la adenina de una banda y la timina de la banda opuesta, y entre la guanina de una banda y la citoxina de la opuesta. Hay muchas pruebas en favor de que estas bandas de nucleótidos estén dispuestas en forma de espirales trenzadas, según demostraron Watson y Crik (*) en 1953. El peso molecular de DNA es por lo menos de seis millones y la

(*) Estando en prensa este discurso les fue otorgado el Premio Nobel de Medicina 1962.

molécula contiene no menos que veinte mil nucleótidos en un largo y delgado filamento o bastón espiral. La variedad en que pueden combinarse las bases en la cadena de nucleótidos es enorme, pero las uniones hidrógeno las dispone de tal manera que la secuencia del nucleótido en una cadena determina automáticamente la secuencia en la cadena complementaria. Esto tiene consecuencias de gran importancia en el proceso de replicación de la molécula de DNA.

Hoy día está bastante aclarado el mecanismo de la síntesis del DNA en la célula, principalmente por los trabajos de Kornberg y sus colaboradores, quienes descubrieron que el enzima polimerasa DNA necesita como sustrato el trifosfato desoxiribonucleósido de las cuatro bases principales (1960). Este sistema enzimático requiere al principio una simple banda de DNA, que puede obtenerse «in vitro» calentando una solución de DNA hasta que las dos bandas que lo forman se separan, y enfriando rápidamente para que no se recombinen. Después se forma una nueva cadena, por el enzima, sobre esta primera banda, con la eliminación de pirofosfato inorgánico de cada trifosfato que es atacado; esta nueva banda o cadena es un complemento exacto del original. Desde que la primera banda se obtiene por la separación de las dos bandas espirales trenzadas originales de DNA, el resultado final es la producción de dos nuevas espirales dobles, cada una idéntica al original. El enzima polimerasa es único en determinar las direcciones de un patrón y reproducir fielmente la disposición de las bases en él. Aunque la experiencia se realiza «in vitro», en un sistema enzimático libre de células, hay evidencias de que en la célula viva se verifique la replicación según el mismo proceso. A pesar de no saberse bien el mecanismo por el que se separan las dos espiras del modelo, una de la otra, hay datos que hablan en favor de que cada espira permanece intacta durante el proceso de replicación. La mayor evidencia se ha obtenido por un experimento muy original planteado y realizado por Meselson y Stahl (1958), quienes fueron capaces de demostrar, que el DNA marcado con el isótopo N-15 (DNA pesado), podría separarse fácilmente del DNA, que contiene N-14 ordinario (DNA ligero), por medio de la técnica de la ultracentrifugación fracciona-

da a alta velocidad. Por ello, hicieron crecer la *E. coli* en un medio con N-15 como única fuente de nitrógeno, hasta que el DNA de todas las pruebas contenía sólo N-15. Después se pusieron las células en un medio que contenía sólo N-14, analizando las células de cada generación. Las células que contenían DNA original formaban una sola banda de DNA pesado. Las células de la primera generación presentaban una sola banda DNA de densidad intermedia entre pesado y ligero. La de la segunda generación dieron DNA intermedio y ligero en igual cantidad. En las generaciones siguientes aumenta el DNA ligero, pero también hay DNA intermedio. Estos hechos concuerdan perfectamente con la hipótesis que durante la replicación las dos bandas de la molécula DNA actúan como un par de patrones complementarios, siendo transmitida intacta cada banda a la generación siguiente.

Finalmente, confirmaron Meselson y Sthal, que cuando se calienta el DNA se rompen las uniones hidrógeno, se separan las dos bandas y puede obtenerse, por centrifugación fraccionada, una banda pesada y otra ligera, según era de esperar. La información genética llevada en el DNA está representada en la secuencia en la que los diversos nucleótidos se disponen a lo largo de la banda de DNA; el número de posibles combinaciones es extraordinario. El DNA se localiza exclusivamente en el núcleo, manifestándose la información bajo la forma de proteínas diversas, incluyendo los enzimas de la célula sintetizados en el citoplasma. El lazo de unión entre el DNA y el mecanismo de síntesis de la proteína en el citoplasma es el RNA.

SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS CITOPLÁSMICAS

Hotchkiss (1960) ha establecido que la información genética de la estructura de las proteínas está codificada en forma de secuencias de nucleótidos en el ácido desoxiribonucleico (DNA). Se admite que las secuencias de nucleótidos en el DNA controlan la formación y estructura de las proteínas por intermedio del RNA y que por esta vía las secuencias de nucleótidos son las portadoras

de los mensajes genéticos. Entre los trabajos dedicados a demostrar este aserto destaca, por lo ingenioso, el de Josse y colaboradores (1961), quienes se valen del sistema polimerasa DNA para determinar las frecuencias de los 16 pares vecinos más próximos. El DNA examinado se emplea como «cebo» para el enzima polimerizante purificado. Uno de los cuatro desoxiribonucleósido 5'trifosfato, p. e., el deoxiguanosina trifosfato, se marca con fósforo radioactivo, que es retenido en el nuevo polinucleótido, el cual, posteriormente, es degradado en 4 desoxiribonucleótidos 3'fosfatos, por los enzimas adecuados. El fósforo radioactivo aparece fijado no en el nucleótido original deoxiguanosina, sino en los vecinos inmediatos que le proceden en la cadena. La distribución de la radioactividad entre los cuatro nucleósidos 3'fosfatos indica la frecuencia relativa con que preceden a la deoxiguanosina.

La síntesis de la proteína en las células se realiza en los ribosomas o partículas ribonucleicas del citoplasma (Zamecnick, 1960). La localización en dos sitios separados espacialmente en la célula, el DNA codificado en el núcleo y el RNA en el citoplasma, de los ácidos nucleínicos que intervienen en la síntesis proteica citoplásmica, ha planteado el problema de cómo puede verificarse el control a distancia de la síntesis proteica. Para solucionar este asunto se admite que la síntesis proteica se verifica por la información genética transferida a los ribosomas por moléculas de ácido ribonucleínico (RNA), sintetizados bajo el control del DNA. El RNA, así formado, serviría como patrón para la formación de nuevo RNA, que controlaría la agrupación de aminoácidos en cadenas de polipéptidos específicos.

Hoy día se sabe que en la síntesis de la proteína intervienen por lo menos tres tipos distintos de RNA : 1.º, el ribosomal ; 2.º, el RNA mensajero, y 3.º, el RNA transfer aminoácido.

Estos tres RNA celulares se diferencian bien por su tamaño, composición, metabolismo y función.

1. *RNA ribosomal*. Por el método de difracción de los rayos X se ha demostrado en los ribosomas de la *E. coli* y en el RNA extraído de ellos, que el RNA y las proteínas presentan una

gran independencia estructural, estando el RNA parcialmente plegado en una estructura espiral doble, que no está alterada en las partículas intactas. Estas moléculas de RNA contienen pequeñas regiones espirales dobles, formadas por la mitad aproximadamente de los nucleótidos, en los que están las bases emparejadas, como en el DNA, a saber: *adenina-uracilo* y *guanina-citosina* (Watson y Crick, 1953).

2.º *RNA mensajero*. La aportación de la información genética a los ribosomas se verifica por intermedio de una pequeña fracción de RNA muy activa, inestable y de vida corta, demostrada con isótopos radioactivos (Monod, Jacob y Gros, 1961), que es la que les lleva el mensaje genético del DNA, por lo que se denomina RNA mensajero, y que se forma sobre el patrón de DNA nuclear, del que se pelaría o desprendería para pasar al citoplasma. Una vez llegado a éste, el RNA mensajero serviría a su vez de patrón para la formación de más RNA.

Además de este RNA de alto peso molecular, hay otra forma de bajo peso molecular, que es soluble (s RNA), que sirve de transfer en la síntesis de las proteínas citoplasmáticas.

Ochoa, nuestro compañero de Academia, sostiene, con sus colaboradores, la existencia de dos sistemas de biosíntesis del RNA. Uno dependiente del DNA nuclear y otro citoplásmico que requiere RNA como patrón en lugar de DNA. En favor de esta hipótesis tenemos la demostración en las bacterias de una RNA polimerasa que sintetiza poliribonucleótidos bajo el control de DNA, de manera que la composición y secuencias de los nucleótidos en los poliribonucleótidos sintetizados están directamente relacionadas con las del DNA que sirvió de «cebo».

El aislamiento de una RNA polimerasa, lo han conseguido el año pasado Weiss y Nakamoto del *Micrococcus lisodeikticus*. Este enzima requiere DNA como «cebo», y los trifosfatos de adenosina, citidina, guanosina y uridina como sustratos, para formar un poliribonucleótido con una relación de bases similar a la del DNA modelo, en la que la timina está reemplazada por uracilo. El análisis de las secuencias vecinas más próximas del poliribonucleótido sintetizado demuestra que las secuencias de los nucleóti-

dos son distintas cuando el DNA «cebo» es diferente. Parece ser que este enzima es el responsable de la síntesis del RNA mensajero y del traslado de la información genética de DNA a la forma funcional RNA.

3.º *RNA transfer-aminoácido.* La existencia en las células de una fracción RNA con la única propiedad de unir ácidos aminados (Hagland, Spehenson, Scott y otros), ha proporcionado la base para explicar el mecanismo de la formación y estructura del complejo RNA-ácidos-aminados.

El mecanismo de formación y estructura de los complejos-amino-ácidos-RNA, es el siguiente: Cada compuesto aminoacil-RNA es formado por un enzima amino-ácido específico, que activa el grupo carboxilo del amino-ácido, formando, en primer lugar, un complejo aminoacil-adenilato y después el correspondiente complejo amino-acil-RNA. Cada aminoácido se une por el grupo carboxilo al grupo ribosa-hidrosil de un residuo terminal de ácido adenílico, en una cadena específica de RNA.

Otro enzima, el enzima transfer, proporciona la transferencia del aminoácido amino-acil-RNA a los péptidos sintetizados en las partículas ribosomales.

Después de haberse demostrado que la síntesis de proteínas citoplásmicas está regida por el RNA, se plantea la cuestión de cómo tiene lugar el agrupamiento de los ácidos aminados en polipéptidos, o dicho de otra manera, por qué mecanismo se verifica la síntesis proteica.

Ochoa hizo una aportación extraordinaria a la solución de este problema, al conseguir la formación de un polímero de ribopolinucleótido por el enzima «polinucleótido fosforilasa», aislado por él del *Azotobacter vinelandii*, incubando el enzima con el difosfato de 5'-ribonucleósido, en presencia de Mg^{++} , demostrando así, por primera vez, el mecanismo biológico que interviene en la formación de los polinucleótidos. Por esta extraordinaria aportación se le concedió el Premio Nobel del año 1959, junto con Kornberg, antes citado.

La trascendencia de este trabajo de Ochoa se aprecia con toda claridad en la serie de trabajos dedicados al estudio de la incorpo-

ración de los ácidos aminados en un sistema *E. coli* en presencia de polinucleótidos sintetizados por el enzima «polinucleótido fosforilasa» de Ochoa.

Speyer, en colaboración con Ochoa y otros, ha demostrado que la incorporación de los ácidos aminados en el sistema *E. coli* mencionado, está condicionada por copolímeros compuestos de 1-2-3 o más polímeros. Así por ejemplo, el polímero U (ácido uridílico) rige la incorporación de la fenilalanina —así como la hacen también los polinucleótidos UC, UA y UG. Con los polinucleótidos compuestos de tres ácidos, de los cuatro ácidos fundamentales : uridílico (U), guanílico (G), adenílico (A), citídilo (C), se consiguen incorporaciones de varios ácidos aminados. Así tenemos que las tripletas de UAC, UCG y UAG regulan la incorporación de 11 ácidos aminados, entre los que están cisteína, leucina, fenilalanina, tirosina, etc. Falta por determinar la ordenación en la secuencia de los componentes de este Código triple, denominado también de «tres letras» para más facilidad, para todos los ácidos aminados excepto para la fenilalanina.

Nirenberg y Matthaei han obtenido el polipéptido polifenilalanina adicionando ácido poliuridílico, esto es, un RNA en el que todas las bases son uracilos, a un sistema, sin células, que puede sintetizar proteínas. Este hecho supone que la fenilalanina esté regida por una secuencia de uracilos, que para Crick sería una tripleta U. U. U. de uracilos.

Según lo expuesto, la clave o código, no superponible, de un ácido aminado es un grupo de tres bases, o múltiplo de tres, menos probable, cuya secuencia hay que leer en un orden determinado a partir de la base primera de la tripleta. Como no hay señal alguna, al no haber «comas» que las separe, puede tomarse como primera base equivocadamente una que no lo es y hacer incorrecta la lectura de las «tripleas». Cuando un ácido aminado esté codificado por más de una tripleta, se habla de código degenerado.

Si fuese posible sintetizar polinucleótidos, cualquiera que sea el procedimiento, químico o enzimático, con secuencias total o parcialmente determinadas de antemano, con las que obtener polipéptidos específicos, se entraría de lleno en el estudio experimental.

del problema de la codificación, que podría estar resuelto en poco más de un año, si se comprueba que la realización del código de «tres letras» es la misma en toda la naturaleza.

LOCUS GÉNICOS

El control genético de la síntesis de los enzimas es común a los microorganismos y otros sistemas vivos. No obstante, dada la fácil manipulación y posibilidades de estudio de las finas estructuras genéticas en los microorganismos, es en éstos en los que se han realizado la mayor parte de las investigaciones sobre este tema. Quizá la generalización mejor establecida sea el trabajo de estos últimos años sobre la estructura del gene. Hoy está comprobado que las mutaciones que afectan a la estructura primaria, esto es, a la secuencia de aminoácidos de una simple cadena sencilla de polipéptidos de una proteína, tiene lugar siempre en el mismo segmento o locus, muy reducido, del cromosoma. A este segmento del cromosoma se le denomina gene estructural.

Gene estructural.—La mayor parte de los casos bien establecidos de genes estructurales se deben a las observaciones de efectos sobre las propiedades de los enzimas más que a la estructura del enzima proteína. Es evidente genéticamente, que la mutación en un gene estructural puede tener lugar en sitios muy diferentes, según demuestra la genética. De los estudios de las propiedades de los enzimas se deduce que cada mutación produce un efecto característico diferente, manifestado por la clase de enzima producido.

Boner y colaboradores (1960) han sido capaces de localizar el gene *tryp-3* en el hongo *Neurospora crassa*. Parece ser que las mutaciones que dan lugar a la pérdida de la capacidad para catalizar la reacción de fosfato de indol-glicerol y serina, respectivamente, tienden a acumularse en extremos opuestos del mapa génico. Mientras que las mutaciones que eliminan toda actividad enzimática lo hacen en una posición intermedia. Es probable que

la molécula del enzima contenga regiones funcionalmente diferentes, determinadas por distintas partes del gene.

Los muy diferentes efectos producidos por la mutación en la actividad del enzima hidrogenasa glutámica en el *Neurospora crassa*, demuestran también el aserto anterior.

La actividad del enzima se comprueba por la dirección de la reacción, que puede ser en dos sentidos, siendo la reacción que sintetiza el glutamato la más sensible y veloz. En una serie de 11 mutantes, que requieren nitrógeno alfa-amino para el crecimiento normal, se ha demostrado que son todas mapeables en un segmento muy corto del cromosoma; en el quinto grupo de uniones, que se conocen como *locus de aminación*, no apreciándose en ellas actividad de la síntesis del glutamato.

Una de las características más acusadas de los sistemas de represión e inducción de enzimas es que los números de enzimas relatados en secuencia en un ciclo metabólico, están a menudo sometidas a un control unitario cuantitativo. Esto es, existe una unidad que coordina los enzimas controlados por una serie de genes estructurales íntimamente asociados, que se denomina *Operon*, según han propuesto Jacob, Perrin, Sánchez y Monod (1960).

El Operon es, por tanto, una unidad genética que rige la función coordinadora y control de un grupo de genes que determinan los enzimas de un ciclo de biosíntesis. Por lo general se admite que el control se ejerce por un represor producido por un locus regulador específico, que actuaría sobre un determinado sitio. Como ejemplo podemos poner el R-try, en el caso de la síntesis del triptofano.

Se supone que adyacente a cada Operon hay un gene especial el *operador*, cuya función consiste en combinar con la sustancia represora, para así conmutar la actividad de todo el segmento en un sentido o en otro.

La acción del represor en los enzimas puede ser en un lugar distinto para cada gene. Una mutación sencilla que produzca sensibilidad en el represor, puede afectar sólo a uno de los

genes y a un enzima de la serie, que al faltar interrumpirá la coordinación y la acción conjunta. Otro mecanismo supone que hay un péptido común a todos los enzimas de la secuencia. La mutación de este locus llevaría consigo la insensibilidad al represor, que en este caso afectaría a todos los enzimas del sistema.

Con esto damos por terminada la exposición concisa y a todas luces incompleta de la nueva citología. Los que vivimos la citología clásica tenemos que variar nuestro concepto de la célula y olvidar muchas cosas para sustituirlas por otras; pasando por la experiencia de que es más difícil olvidar que aprender.

Mucho celebraré que este modesto trabajo estimule a los jóvenes biólogos en sus investigaciones y sea pronto realidad la aportación española a esta novísima rama de la biología. Para ello es imprescindible que se les proporcionen todos los medios de información y trabajo necesarios, con espíritu realista, superando con generosidad la penuria que predomina en los medios científicos.

HE DICHO