

## APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS EN EL ESTUDIO DE LA POLIOMIELITIS \*

CARLOS CAMPILLO SÁINZ  
Académico de número

La propiedad esencial que tienen los virus de multiplicarse exclusivamente en presencia de células vivas, subraya la conveniencia de estudiarlos *in vitro*, por medio de los métodos de cultivo de tejidos. A la consideración anterior se añade, en el caso de la poliomiélitis, la necesidad de encontrar medios accesibles para propagar el virus que, como se sabe, podía ser estudiado sólo en monos y, con más limitaciones, en algunos roedores. Por tanto, no es de extrañar que, ya en 1913, Levaditi hubiera hecho el primer intento de cultivar el agente causal de la poliomiélitis en tejidos de macaco, animal cuya susceptibilidad había sido demostrada pocos años antes por Landsteiner (1908).

Desde entonces, la literatura recoge las tentativas de otros autores (Flexner y Noguchi, 1913; Long y Olitsky, 1930; Gildemeister, 1933) que tampoco tuvieron buen éxito; hasta que Sabin y Olitsky (1936) lograron, por primera vez, cultivar el virus de la poliomiélitis en tejido nervioso de embrión humano. Por desgracia, la experiencia de los últimos autores mencionados no tuvo las repercusiones que eran de esperarse. En efecto, fue necesario que transcurrieran más de diez años para que un brillante grupo de investigadores, encabezado por Enders (1949), volviera a ocuparse del problema en una serie de trabajos que son ya clásicos. Mediante ciertas innovaciones técnicas, los autores citados efectuaron trascendentales observaciones sobre la propagación y comportamiento de los tres tipos de virus de la poliomiélitis en diversos tejidos humanos cultivados.

Dos consecuencias importantísimas han tenido los trabajos de Enders y sus colaboradores: consagrar en definitiva el uso de las técnicas de cultivo de tejidos en la virología e impulsar el estudio de la poliomiélitis según un ritmo hasta entonces sin precedente. El conocimiento de esa enfermedad entra en una etapa de activo progreso, donde los nuevos métodos de cultivo, tantas veces aludidos, encuentran importantes aplicaciones. Analizar estas

\* Trabajo de ingreso leído en la sesión reglamentaria del 21 de julio de 1954.

últimas, a través de mi propia experiencia, constituye el objeto del presente trabajo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Todo cultivo de tejidos consta de dos partes: células vivas y líquido nutritivo.

*El tejido.* Además de ser viable, debe ser susceptible, o sea, capaz de permitir el desarrollo del virus. Hasta ahora, el agente de la poliomiелitis sólo ha podido cultivarse en tejidos humanos y de macaco; pero no en aquellos procedentes de individuos de otras especies. Se han utilizado tejidos humanos embrionarios y no embrionarios. Figuran, entre los primeros, piel y músculo, intestino, riñón, cerebro, corazón, cápsulas suprarrenales y bazo. Los segundos, que comprenden tanto tejidos normales como neoplásicos, se han obtenido mediante intervención quirúrgica y son: tiroides, prepucio, riñón, testículo, útero, embrioma del riñón, neuroblastoma y adenocarcinoma del cuello uterino.

El testículo y el riñón del macaco constituyen excelentes materiales de cultivo. El riñón, tanto humano como de mono, se considera, por ahora, el tejido de elección.

*El líquido de cultivo.* Muchos de ellos han sido propuestos; los hay sintéticos y naturales. Unos y otros pueden usarse a condición de que llenen los siguientes requisitos: isotonía, acción amortiguadora de los cambios del equilibrio ácido-básico, presencia de factores que estimulen el crecimiento celular y provengan su autólisis, así como la adición de antibióticos para eliminar los organismos contaminantes. La economía y la facilidad de preparación son también cualidades que deben tomarse en cuenta.

### DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Los métodos de cultivo de tejidos que se aplican en la actualidad al estudio de la poliomiелitis se inspiran en los principios básicos magistralmente trazados por los primeros investigadores en este campo. Los nombres de Harrison, Carrel, Maitland y otros, presiden todavía este capítulo. Las técnicas de cultivo de tejidos alcanzaron rápida difusión tan pronto como fue posible sortear el obstáculo de la contaminación microbiana, por medio de las sulfadrogas primero y con el auxilio de los antibióticos después. Así, poco a poco la compleja manipulación de los métodos clásicos se resolvió en la

relativa simplicidad de los actuales. A continuación serán descritos brevemente:

*Método de las células suspendidas.* Es original de Maitland (1928) y consiste en suspender en el líquido nutritivo cantidades adecuadas del tejido finamente dividido. La suspensión se coloca dentro de un matraz que se tapa con firmeza y se incuba a 35 grados centígrados. Enders introdujo dos modificaciones: por una parte, acortó a dos o tres días el intervalo entre los cambios de líquido nutritivo con el objeto de mantener por más tiempo la viabilidad del tejido y, por otra, alargó el lapso de separación entre los subcultivos que practicaba cada 16 a 25 días con el mismo líquido de los cultivos previamente inoculados. Aseguraba en esta forma el contacto prolongado del virus con las células y con ello la posibilidad de que aquel alcanzara títulos de cierta magnitud.

*Método de los tubos rotatorios.* Gey y Bang (1939) los aplicaron por primera vez en el estudio de los virus. En lugar de matraces se utilizan tubos que, colocados en posición casi horizontal, giran con lentitud en dispositivos especiales. Los pequeños fragmentos del tejido se mantienen adheridos a las paredes del tubo merced al plasma coagulado que les sirve de elemento de sostén. La rotación del tubo hace que el tejido se ponga alternativamente en contacto con las fases líquida y gaseosa del sistema, con objeto de facilitar la respiración y el crecimiento celulares.

*Ventajas y desventajas de los dos métodos.* El método de las células suspendidas es de ejecución fácil y proporciona rendimiento apreciable; sin embargo, tiene el inconveniente de que la multiplicación del virus se efectúa con lentitud y como, por otra parte, las células no dan lugar a proliferaciones, es imposible observar en ellas el efecto citopatogénico del virus a que después se hará referencia. El método de los tubos rotatorios, aunque más laborioso y menos adecuado para la práctica de cultivos en gran escala, tiene la indiscutible ventaja de estimular el crecimiento de células nuevas sobre las que directamente puede observarse la acción del virus, cuyo ritmo de multiplicación es asimismo mayor.

Recientemente, después de las observaciones de Li y Schaeffer (1953), se ha generalizado el uso de los tubos estacionarios, método en el que se aprovecha la propiedad del tejido de riñón de originar abundante proliferación de células epiteliales que se adhieren por sí mismas a las paredes del tubo.

Es el más aconsejable, puesto que aúna a su sencillez las ventajas de los dos métodos anteriores. Creo necesario añadir que, en lo personal estoy familiarizado con el manejo de los distintos métodos. Mi entrenamiento fue dirigido por el propio doctor Enders, durante un año de estancia en su

laboratorio de Boston, Mass. A continuación tuve oportunidad de visitar otros centros similares en Estados Unidos de Norteamérica. En la actualidad estoy organizando el laboratorio de cultivo de tejidos que el Centro de Estudios Sobre la Poliomiélitis tiene instalado en el Instituto Behring de esta ciudad.

#### APLICACIONES DE LOS MÉTODOS

Serán consideradas en relación a los distintos capítulos de la poliomiélitis.

##### A. *Etiología.*

El comportamiento del virus de la poliomiélitis en cultivo de tejidos será analizado aquí.

Para afirmar que el virus de la poliomiélitis se multiplica en cultivo de tejidos, es necesario demostrar su acción patógena específica en animales susceptibles. Con este objeto, se toman periódicamente muestras del cultivo —ya sea del líquido nutritivo o del propio tejido— que se inoculan por las vías adecuadas a monos o a ratones si se trata del virus del tipo 2. Las muestras que producen resultados positivos se titulan en esos mismos animales. Al comparar los títulos de las distintas muestras se pueden determinar la velocidad y el grado de multiplicación del virus en el tejido, cuando ésta tiene lugar. En forma similar, se demuestra la propagación del virus en serie, a través de subcultivos. Sólo que aquí, al cabo de cierto número de pases, la “concentración real” del virus de una muestra determinada es millones de veces superior a la “concentración calculada” que resultaría del simple proceso de dilución en serie, en caso de que el virus no se hubiera multiplicado. Es así como se ha probado que el virus de la poliomiélitis no sólo se multiplica en un cultivo aislado, sino que también es capaz de propagarse *indefinidamente* en serie, por medio de subcultivos. En otras palabras, los cultivos de tejidos son fuentes inagotables de producción de virus.

Una vez admitido que el virus se multiplica en cultivo de tejidos, se ha procedido a estudiar la acción del mismo sobre las células susceptibles. Se observa que tiene la propiedad de producir en ellas cambios degenerativos que se caracterizan por picnosis nuclear, presencia de granulaciones citoplásmicas anormales, alteraciones de la morfología celular con tendencia a la adopción de formas redondeadas, pérdida del ordenamiento de las células y necrosis final. Al conjunto de esos cambios se da el nombre de “efecto citopatogénico” del virus. Dicho efecto es específico, puesto que

DISTRIBUCION DE LOS TRES TIPOS DEL VIRUS de  
 1<sup>o</sup> POLIOMIELITIS EN VARIOS BROTES EPIDEMICOS

AUTOR	LOCALIDAD	AÑO	TIPO 1 Brunhilde	TIPO 2 Lansing	T. 3 Leon	TOTAL
<i>Robbins F.C.</i>	Boston, Mass.	1950	3	0	19	22
<i>Younger J.S.</i>	Pittsburgh, Pa.	1949 1951	28	0	9	37
<i>Riordan J.F.</i>	Easton, Pa.	1950	12	1	3	16
<i>Ramos Alvarez M.</i>	Lock Haven, Pa.	1952	34	11	0	45
<i>Kibrick S.</i>	Boston, Mass.	1952	38	8	7	53
<i>Campillo C.</i>	México, D.F.	1953	9	0	0	9

se evita por la neutralización del virus por el anticuerpo correspondiente y atributo común a los tres tipos de virus de la poliomiélitis que dan lugar a imágenes indiferenciables entre sí; pero distintas de las que otras virus producen. El efecto citopatogénico se manifiesta en las células de todos los tejidos susceptibles. Finalmente, es índice fiel de la actividad del virus, y constituye, por tanto, el criterio para efectuar en los cultivos titulaciones que arrojan valores comparables a las que se obtienen en animales.

La acción destructiva del virus sobre las células, sugiere alteraciones profundas del metabolismo, que se reflejan por la disminución correlativa del consumo de oxígeno por los tejidos inoculados. En la práctica, la alteración se traduce por el menor descenso del pH de los cultivos inoculados en comparación con los normales. La diferencia oscila entre 0.2 a 0.4 de unidad. El cambio del pH es más tardía en su aparición que el efecto citopatogénico, ya que éste es aparente entre el 2º al 6º días, mientras que aquel tarda 16 ó 30 en manifestarse. En las células neoformadas de los fragmentos de tejidos cultivados en los tubos rotatorios o estacionarios puede seguirse paso a paso el efecto citopatogénico por observación microscópica directa a bajo aumento. En cambio, las alteraciones del pH son más aparentes en el sistema de cultivo de las células suspendidas.

## B. Patogenia.

Al demostrarse que el virus de la poliomiélitis podía ser cultivado en tejidos de naturaleza *no nerviosa*, se sentaron las bases de la actual concepción patogénica de la enfermedad.

El hallazgo indujo a desterrar la idea tan arraigada que existía sobre el carácter neurotrópico estricto del virus de la poliomiélitis. Resultado de lo anterior fueron las experiencias de Horstman (1952) y Bodian (1952) en chimpancés, quienes demostraron la existencia de una fase de viremia en el período preparalítico de la infección, hecho que fue verificado poco después, en los seres humanos (Horstman, 1953). Como, por otra parte, ya se conocía que el virus se elimina por las materias fecales, la multiplicación de aquel fuera del tejido nervioso de los organismos infectados, fue finalmente reconocida por la mayoría. En la actualidad se admite que el virus, que habitualmente penetra en el organismo por la vía oral, se multiplica, primero, en las paredes del tracto digestivo, después, en el lecho vascular y, por último, en el sistema nervioso. El proceso puede interrumpirse en cualquier momento de su evolución para terminar indistintamente en alguna de las fases señaladas: digestiva, vascular o nerviosa. Aun el desarrollo de esta última puede detenerse antes de haber alcanzado lo que podría con-

siderarse su término natural, como lo prueba la existencia de las formas de la enfermedad llamadas "no paralíticas". Por tanto, es necesario considerar al lado del virus determinante de la infección, el papel del anticuerpo específico que tiende a contrarrestarla. A cada fase invasora del primero, corresponde otra antagónica de producción de anticuerpos y dentro de este sistema de acción y reacción, la magnitud y persistencia de la respuesta inmunitaria será proporcional al estímulo que la desencadena. Así, la fase digestiva de multiplicación del virus representa un estímulo tan eficaz como el de la fase vascular, aunque más lento, mientras que la pululación del virus en el sistema nervioso trae consigo una respuesta inmunitaria pobre y tardía. De ahí que la poliomielititis en sus formas abortiva y no paralítica se refleja, en la sangre, por respuestas inmunológicas muy semejantes a las que se encuentran en las formas paralíticas. De ahí también la dificultad para descubrir la viremia en la infección natural, puesto que la fase vascular de multiplicación del virus tiende a destruirse a sí misma, en virtud de la enérgica respuesta inmunitaria que es su obligada consecuencia. Los anticuerpos, como se sabe, ya están presentes en el torrente sanguíneo desde los primeros días que siguen a la aparición de la parálisis. Por todo lo dicho, es fácil comprender el alcance de las repercusiones que el hallazgo de la viremia ha tenido en la práctica. Baste mencionar que todos los intentos de prevención activa o pasiva de la poliomielititis, en su forma paralítica, se inspiran en la idea de que el virus que circula por la sangre puede ser destruido por los anticuerpos específicos, antes de invadir el sistema nervioso central.

### C. *Diagnóstico.*

Gracias a los métodos de cultivo de tejidos, el diagnóstico etiológico de la poliomielititis se ha incorporado a la práctica diaria.

Desde el punto de vista del aislamiento y tipificación del virus, los nuevos métodos son incomparablemente más sencillos y económicos que las técnicas de inoculación al mono. Se parte, por lo general, de las materias fecales de los enfermos, las cuales se tratan en forma adecuada para suprimir las bacterias contaminantes. Sabin utiliza el producto del raspado de la mucosa rectal, obtenido por medio de un hisopo estéril.

El inóculo se deposita en tubos de cultivo que exhiban abundante proliferación de células neoformadas sobre las que se observará el efecto citopatogénico, en caso de que el virus haya podido aislarse. El siguiente paso es identificarlo por medio de las pruebas de neutralización. Con este fin se mezclan —a partes iguales y en diluciones convenientes— los líquidos de

los cultivos que revelaron efecto citopatogénico, con cada uno de los antisueros prototipos de los tres virus de la poliomielitis. Una vez incubadas las mezclas a temperaturas y por tiempos que varían de acuerdo con la técnica empleada, se procede a inocular con ellas nuevos tubos de cultivo. Si el virus fue neutralizado "in vitro" por el anticuerpo homólogo, no dará lugar a la aparición del efecto citopatogénico en los tubos que hayan recibido la mezcla correspondiente.

La eficacia de los métodos de aislamiento y tipificación de los virus de la poliomielitis por medio de cultivo de tejidos puede ilustrarse con la siguiente experiencia realizada por mí durante el verano de 1953: se tomaron algunas muestras de materias fecales de 10 niños internados en el Hospital Infantil de México, D. F., con diagnóstico clínico de poliomielitis parálitica en la fase aguda, y al aplicar los métodos antes descritos, se lograron aislar nueve cepas de virus de la poliomielitis que cayeron, en su totalidad, dentro del tipo 1 ó Brunhilda.

#### D. *Epidemiología.*

Los métodos de cultivo de tejidos son el mejor instrumento para emprender encuestas epidemiológicas. Así ha podido estudiarse la distribución de los tres tipos de virus en los brotes epidémicos, tal como lo muestra el cuadro siguiente:

DISTRIBUCIÓN DE LOS TRES TIPOS DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS  
EN VARIOS BROTES EPIDÉMICOS

Autor	Localidad	Año	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Total
			Brunhilda	Lansing	León	
Robbins, Enders y Weller	Boston, Mass.	1950	3	0	19	22
Younger, J. S.	Pittsburgh, Pa.	1949-51	28	0	9	37
Riordan, J. F.	Easton, Pa.	1950	12	1	3	16
Ramos Alvarez, M.	Lock Haven, Pa.	1952	34	11	0	45
Kibrick, S.	Boston, Mass.	1952	38	8	7	53
Campillo, C.	México, D. F.	1953	9	0	0	9

De su observación se desprenden dos hechos importantes: 1) que en la producción de un mismo brote intervienen cepas de dos y hasta de los tres tipos del virus, y 2) que el tipo 1 ó Brunhilda se encuentra con mayor frecuencia que los otros dos.

La última afirmación se aplica también al brote de México, D. F., en 1953, aunque el corto número de casos haya, tal vez, impedido aislar más de un tipo.

El marcado predominio del virus del tipo 1 en los brotes de poliomielitis es tanto más sorprendente, cuanto que las encuestas serológicas han demostrado la amplia difusión del tipo 2 entre los individuos sanos de la comunidad. Surge entonces el problema de correlacionar la naturaleza del agente etiológico con la modalidad clínica de la infección. En dos áreas —una epidémica y la otra con baja morbilidad— Melnick (1954) no encontró diferencias significativas en la distribución de los tipos de virus que fueron responsables de los casos paralíticos y no paralíticos. Por otra parte, Sabin (1954) refiere que en una encuesta practicada en 1500 niños sanos, se aislaron 29 cepas de virus de la poliomielitis, entre los cuales cinco (que pertenecían al tipo 2) fueron totalmente avirulentos para el mono por la vía intracerebral.

Hay, según esto, toda una gama de variación en el poder patógeno de las distintas cepas que afectan al hombre.

Se desconocen los factores que determinan, en condiciones naturales, la aparición de cepas atenuadas y tampoco se sabe hasta qué punto puedan éstas interferir con las que no lo son. Es muy posible que las cepas avirulentas que se encuentran en la naturaleza puedan utilizarse en la elaboración de vacunas.

Los métodos de cultivo de tejidos se han aplicado al descubrimiento de los casos no aparentes de la poliomielitis. Durante una estación epidémica, se computó, por primera vez de manera directa, el número proporcional de infecciones clínicas y subclínicas, que osciló desde seis hasta 16 por 1,000 (Melnick, 1954).

Por último, las encuestas serológicas han recibido gran impulso. Los datos recogidos apoyan la idea clásica sobre la influencia de las malas condiciones higiénicas de la localidad en la aparición temprana de los anticuerpos sanguíneos.

#### E. Inmunidad y prevención.

Las aportaciones de los métodos de cultivo de tejidos al estudio de la inmunidad en la poliomielitis, serán compendiadas en tres incisos:

##### 1. Susceptibilidad de especie y de tejido.

Los tejidos susceptibles a la acción del virus "in vitro" provienen de animales que también son susceptibles y viceversa. A título de excepción se mencionan los virus del tipo 2 que no se propagan en tejidos de ratón, a pesar de ser infectantes para ese roedor. El paralelismo entre susceptibilidad de especie y de tejido, merece, por tanto, subrayarse.

##### 2. Disociación entre inmunidad humoral y tisular.

El punto ha sido objeto de enconadas discusiones. En la práctica era importante investigar si los tejidos de animales inmunes podían soportar la multiplicación del virus. La duda quedó resuelta en sentido afirmativo, cuando Ledinko (1952) logró cultivar el virus en testículos de monos inmunes. De donde podría concluirse que la inmunidad en la poliomielitis no es un "proceso global" que se manifiesta en todas las células susceptibles de un organismo.

### 3. Posibilidad de la obtención de mutantes.

Las miras de muchos investigadores están puestas en la posibilidad de obtener mutantes del virus bajo el efecto de su larga permanencia en tejidos cultivados. El proceso de adaptación de aquel a tejidos no nerviosos justifica una esperanza que cuenta ya con antecedentes muy dignos de recordarse, como es la mutante que dio lugar a la vacuna de la fiebre amarilla.

Algo se ha conseguido ya en ese sentido, puesto que Enders, Schaeffer y Sabin han hablado de la disminución de la virulencia para el mono de algunas cepas mantenidas en tejidos.

Finalmente, los métodos que nos ocupan han hecho posible que surjan los nuevos recursos preventivos que actualmente se ponen en juego contra la poliomielitis. Los hechos se sucedieron, como ya quedó explicado —cultivo del virus en tejidos no nerviosos, aceptación de la fase de viremia, nueva concepción patogénica de la enfermedad— hasta que la aparición de la globulina gamma y de la vacuna constituyó el último eslabón de la cadena.

Elemento de protección pasiva, la globulina gamma no aspiraba a ser la respuesta definitiva del problema. El verdadero mérito de las vastas experiencias en que se utilizó fue el de preparar el terreno para el advenimiento de recursos más efectivos. La vacuna de Salk se prepara en cultivo de tejidos. El virus se cultiva en riñón de mono y se inactiva con formaldehído; se trata, de una vacuna de virus muerto. Sus ventajas son las siguientes: 1) costo reducido; 2) facilidad de elaboración en gran escala, y 3) ausencia de tejidos nerviosos. Experimentalmente su poder preventivo ha sido demostrado en monos y en la actualidad se ensaya en miles de niños.

En párrafos precedentes fue considerada la posibilidad de obtener vacuna con virus atenuados en cultivo de tejidos.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

En unos cuantos años los métodos de cultivo de tejidos han revolucionado nuestros conocimientos sobre la poliomiélitis. Sus aplicaciones se extienden a la mayoría de los capítulos de estudio de esa enfermedad. En efecto, el capítulo etiológico se enriquece con la adquisición de nuevos datos sobre el agente y su mecanismo de acción; la patogenia se reconstruye casi en su totalidad; el diagnóstico se vuelve asequible a la práctica diaria; se dilata el campo de las encuestas epidemiológicas a la par que se facilitan las investigaciones sobre los problemas inmunológicos; y, finalmente, se abren halagüeñas perspectivas en el campo preventivo.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

Our knowledge on poliomyelitis has been revolutionized in a few years by the methods of culture on living tissues. Such knowledge is applied to most chapters on the study of such condition. Its etiology acquires new data on the agent and its mechanism of action; its pathogeny is almost completely reconstructed; diagnosis becomes easier on daily practice; the solution of epidemiological and immunological problems is approached; and, finally, good prospects are advanced in the field of prophylaxis.

## REFERENCIAS

1. *Bodian, D.*: Am. J. Hyg., 55: 414, 1952.
2. *Campillo, Sainz, C.*: Datos no publicados.
3. *Enders, J. F., Weller, T. H. y Robbins, F. C.*: Science, 109: 85, 1949.
4. *Enders, J. F.*: J. Immunol. 69: 639, 1952.
5. *Flexner, S. y Noguchi, H.*: J. Exper. Med., 18: 461, 1913.
6. *Gey, G. O. y Bang, F. B.*: Bull. Johns Hop. Hosp., 65: 393, 1939.
7. *Gildemeister, E.*: Deutschamed. Wchnschr., 59: 877, 1933.
8. *Horstmann, D. M.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 79: 417, 1952.
9. *Horstmann, D. M.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 82: 434, 1953.
10. *Kibrick, S. y Enders, J. F.*: Citado por Weller, T. H. New England. J. Med., 249, 1953.
11. *Landsteiner, K.*: Sémaine Méd., 28: 620, 1908.
12. *Ledinko, N. y Melnick, J. L.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 81: 144, 1952.
13. *Levaditi, C.*: Compt. Rend. Soc. Biol., 75: 202, 1913.
14. *Li, C. P. y Schaeffer, M.*: Science, 118: 107, 1953.
15. *Long, P. H. y Olitsky, P. K. y Rhoads, C. P.*: J. Exper. Med., 52: 361, 1930.
16. *Maitland, H. B., y Maitland, M. C.*: Lancet, 2: 596, 1928.
17. *Melnick, J. L.*: Am. J. Pub. Health., 44: 511, 1954.
18. *Ramos-Alvarez, M., Girardi, A. J. y Melnick, J. L.*: Datos no publicados.
19. *Riordan, J. F., Ledinko, N., y Melnick, J. L.*: Am. J. Hyg., 55: 339, 1952.
20. *Sabin, A. B. y Olitsky, P. K.*: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 34: 357, 1936.
21. *Sabin, A. B.*: Comunicación personal.
22. *Younger, J. S., Lewis, L. C., Ward, E. N. y Salk, J. E.*: Am. J. Hyg., 55: 347, 1952.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL  
DR. CARLOS CAMPILLO SAINZ

LUIS GUTIÉRREZ VILLEGAS  
Académico de número

Ha sido particularmente satisfactorio para mí recibir del Señor Presidente de la Academia la comisión de comentar el trabajo de ingreso que presenta esta noche el doctor Carlos Campillo Sáinz.

Aparte de considerar al doctor Campillo como un excelente amigo y colaborador, reconozco en él uno de los valores científicos jóvenes de más realce en el campo de la virología, a la que ha dedicado estudios especiales en la Universidad de Berkeley y en el Laboratorio del Children's Hospital de Boston.

Posteriormente ha iniciado sus investigaciones personales en el Centro de Estudios sobre Poliomieltis de esta ciudad y en el Instituto de Enfermedades Tropicales, y es además profesor de Clínica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en la Facultad de Medicina.

El trabajo del doctor Campillo Sáinz que acabamos de escuchar, comprende dos aspectos, a cual más interesante; por una parte, pone de manifiesto la importancia de los métodos, aplicaciones y consecuencias del cultivo del virus de la poliomieltis efectuado en cultivo de tejidos; y por otra, expone su experiencia personal en este problema, que ha tenido la oportunidad de estudiar al lado de Enders en Boston y en el Laboratorio de virus del Centro de Estudios sobre Poliomieltis en México.

La característica de los virus de no multiplicarse sino exclusivamente en presencia de células vivientes, fue hasta hace poco un obstáculo que limitó en forma importante las investigaciones virológicas, reducidas en un principio a la inoculación en animales susceptibles y posteriormente mejoradas con el cultivo en embriones, particularmente en el huevo embrionado de gallina, en el que se han utilizado según el caso, el propio embrión o las membranas del huevo.

El perfeccionamiento de las técnicas de cultivo de tejidos ha permitido obtener una sobrevida larga de los elementos celulares, así como su multiplicación prácticamente indefinida; y el uso de los antibióticos que impiden la contaminación bacteriana, causa de muchos fracasos en el pasado, ha

permitido el manejo de los virus en una forma hasta hace poco tiempo imposible de lograr.

Sí, por otra parte, consideramos los requerimientos de los virus para desarrollar específicamente sólo en determinadas especies animales y estirpes celulares, como es el caso del de la poliomielitis, que hasta la fecha sólo se ha logrado cultivar en tejidos humanos y de algunas especies de monos, salta a la vista la importancia de poder disponer, con relativa facilidad, de cultivos de tejidos de origen humano, que son particularmente susceptibles a los virus que tienen acción patógena en el hombre.

A todo esto, hay que agregar el factor económico, que es totalmente favorable al cultivo de tejidos, puesto que varios cientos de tubos de cultivo cuestan menos que un chimpancé o un macaco.

En la actualidad, ningún laboratorio de virus podría trabajar satisfactoriamente, si no contara con un buen departamento de cultivo de tejidos.

Campillo señala en su trabajo, en una forma general, los requerimientos y algunos de los métodos más usados en el cultivo de tejidos. Después de escucharlo, tenemos la impresión de que un cultivo de tejidos es de muy fácil realización, pero desgraciadamente en la práctica no sucede así.

Es necesario que concurren numerosos factores, que van desde las condiciones especiales que deben llenar los útiles de cristal, hasta la pureza de las substancias químicas que componen las soluciones, la concentración iónica, la ultrafiltración, la utilización de enzimas y factores de crecimiento, etc., para obtener un adecuado desarrollo celular que dé base a la multiplicación del virus.

Estas dificultades no han sido obstáculo para que se haya llegado con relativa rapidez a un perfeccionamiento técnico, comparable al que poseemos hace tiempo para el estudio de las bacterias.

La particularidad de trabajar sobre un medio viviente da a estos cultivos posibilidades que permiten estudiar la reacción celular a los virus, así como introducir modificaciones del medio por la adición de hormonas, enzimas o substancias del orden de los anticuerpos, que permiten estudiar *in vitro* la respuesta de los virus a estos diferentes factores.

En el tubo de cultivo de tejidos, estamos en posibilidad de realizar, con los virus, todas las manipulaciones microbiológicas necesarias para el aislamiento, tipificación, multiplicación y conservación de las cepas.

El doctor Campillo ha podido aislar y clasificar, a pesar de ciertas condiciones desfavorables, nueve cepas de virus de poliomielitis en diez casos estudiados; estos resultados son los primeros de una investigación en curso y comprueban la eficacia del método.

En el trabajo se menciona con detalle el efecto "citopatogénico" de los virus en los cultivos celulares, hecho de gran importancia, que permite observar al microscopio las alteraciones citológicas producidas por el virus en unas cuantas horas, lo cual ha simplificado y acertado el tiempo de las observaciones.

El cultivo de los virus sobre tejidos y su acción citopatogénica, junto con el uso de los sueros neutralizantes específicos, pone en nuestras manos los elementos necesarios para el diagnóstico virológico de la poliomiélitis, cuyas consecuencias sobre los estudios clínicos, epidemiológicos e inmunológicos, son de gran alcance.

En efecto, ya no será necesario contar con gran cantidad de monos para hacer el aislamiento de virus en épocas epidémicas y será posible investigar en gran escala los casos subclínicos y los portadores, así como lanzarnos en busca de cepas atenuadas que son una promesa para la inmunización.

Es necesario subrayar de manera especial el hecho señalado por Campillo, sobre la posibilidad de cultivar el virus de la poliomiélitis en tejidos diferentes del nervioso, lo que echa por tierra el neurotrópismo exclusivo que se atribuía al virus poliomiélico y también las investigaciones de Horstman y Bodian, que comprobaron una fase de viremia en el período pre-paralítico.

Estos hechos ayudan a aclarar la patogenia de la poliomiélitis que actualmente se considera con una primera fase digestiva, una segunda vasculohemática y una tercera nerviosa; la interrupción del proceso infeccioso antes de llegar a la lesión nerviosa por los anticuerpos elaborados por el propio organismo, nos explica el número tan grande de infecciones subclínicas no paralíticas, y también la posibilidad de la prevención de las lesiones nerviosas por medio de la inmunización tanto activa como pasiva.

Creo que el futuro de la inmunización contra la poliomiélitis, está en imitar el proceso natural de la infección, empleando cepas atenuadas de virus aplicadas por vía oral, y si en esta enfermedad se comprueba lo que en otras virosis, de que el recién nacido posee, aunque de manera transitoria, los anticuerpos de la madre, el momento más oportuno de esta vacunación sería dentro de los dos primeros meses de vida.

La producción de virus en cultivo de tejido tiene otras ventajas que no quiero dejar de señalar, como son su obtención en grandes cantidades, tal como es necesario, para la fabricación de vacunas y antígenos diagnósticos, y la circunstancia de quedar eliminadas numerosas sustancias extrañas, que son imposibles de excluir en las cosechas de virus por inoculación de animales.

El doctor Campillo ha pasado revista a la luz de los últimos conocimientos, a los puntos clave del estudio viriológico de la poliomielitis. Lo ha hecho con la mesura de un investigador y con la precisión de quien conoce a fondo el problema. Su experiencia personal sobre cultivo de tejidos y sus aplicaciones al estudio de la poliomielitis son una garantía para esperar magníficos resultados de las investigaciones que tiene en marcha.

Reciba el doctor Campillo Sáinz mis cordiales felicitaciones por su trabajo y por su ingreso a esta Honorable Academia, que desde esta noche lo considera como Miembro Numerario y tenga presente que, si grande y merecido es el honor, también grande y definitiva es la responsabilidad que hoy adquiere por su designación académica.