

BIBLIOTECA IBYS DE CIENCIA BIOLÓGICA

*

KARL BUCHER y ROBERT DOERR

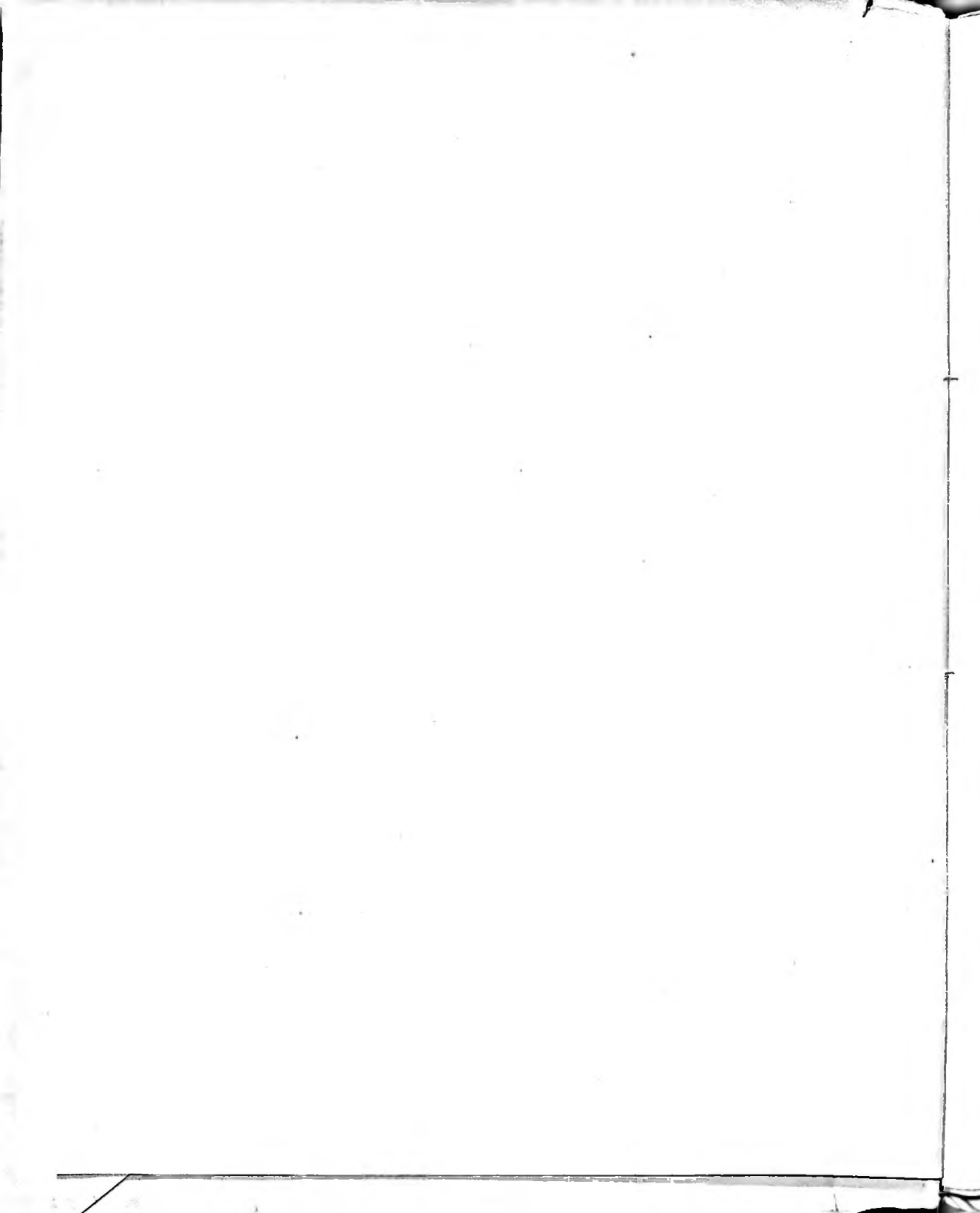
Las investigaciones sobre inmunidad

TOMO QUINTO

HABITUACIÓN
A
VENENOS NO ANTIGÉNICOS



Revista de Occidente
MADRID



B I B L I O T E C A I B Y S



D E C I E N C I A B I O L Ó G I C A

PHYSIOLOGICAL

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD
(TOMO CUARTO)

HABITUACION A VENENOS NO ANTIGENICOS

LAS INVESTIGACIONES SOBRE INMUNIDAD

RESULTADOS Y PROBLEMAS
RECOGIDOS EN MONOGRAFIAS

DIRIGIDAS POR EL
PROFESOR R. DOERR
Basilea

TOMO PRIMERO

LOS ANTICUERPOS
(PRIMERA PARTE)

TOMO SEGUNDO

EL COMPLEMENTO

TOMO TERCERO

LOS ANTIGENOS

TOMO CUARTO

LOS ANTICUERPOS
(SEGUNDA PARTE)

TOMO QUINTO

HABITUACION A VENENOS NO ANTIGENICOS

HABITUACION A VENENOS NO ANTIGENICOS

Habitación en los organismos superiores.—Elevación inducida de la resistencia de protistas frente a sustancias inhibidoras del crecimiento y microbicidas.—
Inmunidad natural contra venenos no debida a antitoxinas.

POB

KARL BUCHER Y ROBERT DOERR

Basilea

Basilea

Traducción de la edición original alemana por

F. CORDÓN

Jefe del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Ibya

Revista de Occidente

Barbara de Braganza, 12

Madrid

A MODERNA
OBRERA
ECONOMIA
DE

Copyright by
IBYS, S. A.
Madrid * 1953

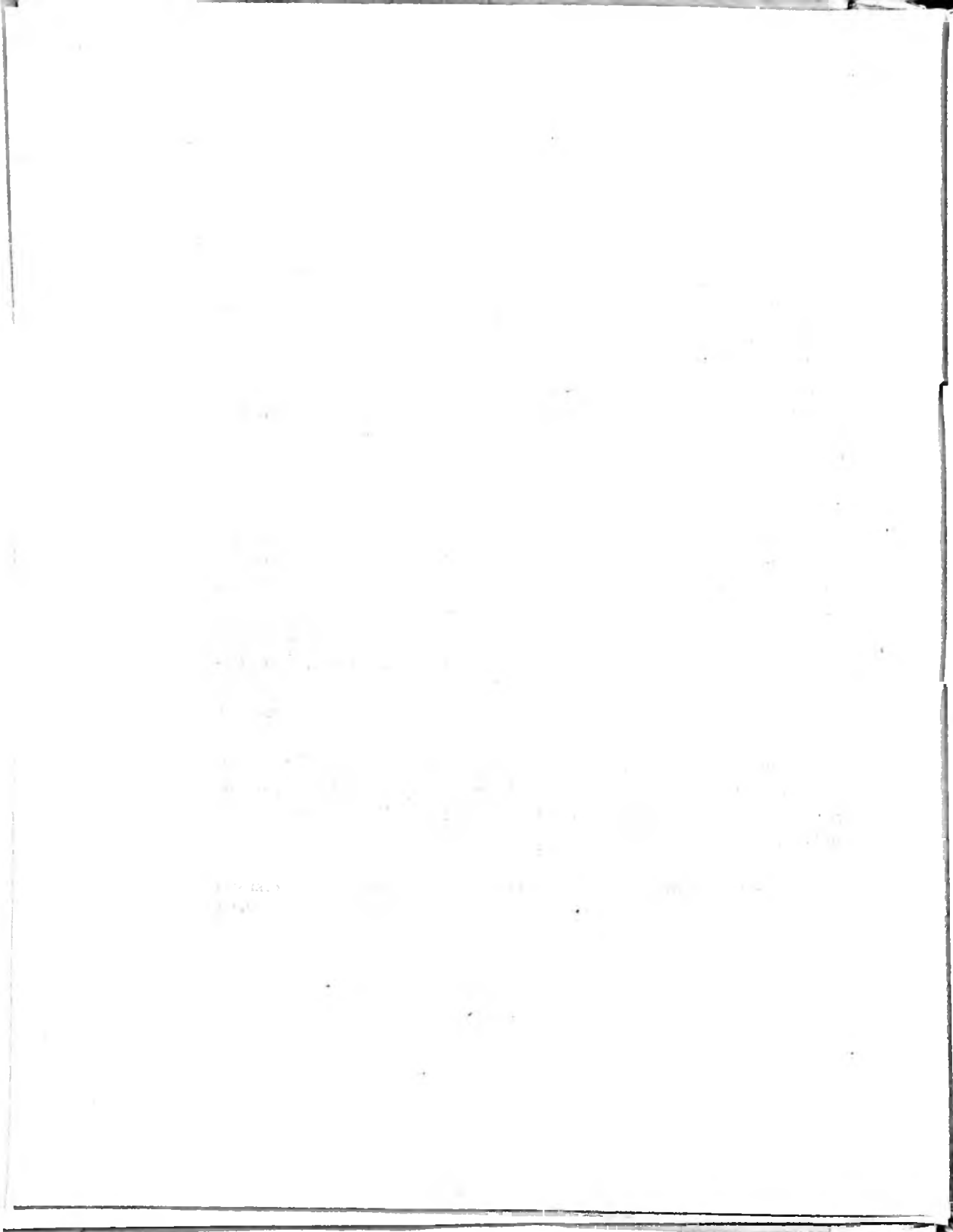
Imp. Viuda de Galo Sáez, Mesón de Paños, 6. Tel. 21-19-44. Madrid.

En la Biblioteca Iby de Ciencia Biológica nos proponemos editar una serie de obras en que se recojan las disciplinas fundamentales de las ciencias biológicas

Sólo se incluirán tratados de máxima autoridad, que, además, expongan con todo rigor crítico el estado actual de la pertinente rama científica, de modo que los conceptos e hipótesis no aparezcan desvinculados de los hechos que han forzado su nacimiento, y así el lector estudioso pueda penetrarse fácilmente del grado de certidumbre y generalidad de las teorías vigentes.

En definitiva, la Biblioteca Iby constará únicamente de obras que, por lo científico de su exposición (purgada en lo posible del dogmatismo casi inevitable en los manuales de texto), descubran, entre el cúmulo de adquisiciones objetivas, los problemas que esperan solución del investigador atento y libre de prejuicios. Esperamos contribuir con ella a desarrollar entre nosotros la afición por la experimentación biológica, y a ayudar a que Médicos, Farmacéuticos, Veterinarios, Naturalistas, Ingenieros Agrónomos, etc., puedan elevar hasta una consideración científica los problemas que les plantea la práctica diaria.

Las dos empresas que aúnan sus esfuerzos en esta Biblioteca han sentido su necesidad desde puntos de vista muy distantes, pero convergentes, y esperan interesar en ella a un círculo de lectores escogidos, cada vez más amplio.



INDICE

	PÁGS.
INTRODUCCIÓN	I
CAPÍTULO PRIMERO.—Los fenómenos de habituación en los organismos superiores	12
Diferencia entre taquiflaxia y habituación.....	13
Taquiflaxia	14
Descripción del fenómeno	14
Mecanismo de la acción	17
Habituación	20
Aparición de la habituación	20
Duración de la habituación	23
Sustancias que producen habituación	25
La habituación a la morfina	26
Mecanismo de la acción, pág. 28.—La teoría de GIOFFREDI, página 28.—La teoría de FAUST, pág. 28.—La teoría de CLOETTA, página 29.—La teoría de TATUM y colaboradores, pág. 30.—La teoría de AMSLER.	
La habituación a la cocaína	32
Mecanismo de la acción pág. 34.	
La habituación al alcohol	35
Grado de habituación, pág. 35.—Mecanismo de la acción pág. 36.	
La habituación a los derivados del ácido barbitúrico.....	39
La habituación a la cafeína	42
Mecanismo de la acción, pág. 44.	
La habituación a la nicotina	44
Mecanismo de la acción, pág. 46.	
La habituación a la histamina	47
Habituaciones a otras sustancias	49
Causas de la habituación	50
Habitabilidad desigual a distintas acciones	50
Habituación inespecífica	52
La habituación considerada como fenómeno de adaptación.....	55
CAPÍTULO II.—Elevación inducida de la resistencia de protistas frente a sustancias inhibidoras del crecimiento y microbicidas.....	61
I. Elevación de la resistencia <i>in vitro</i>	61
a) Las primeras observaciones y su importancia.....	61

	PÁGS.
b) La pluralidad de sustancias contra las cuales puede exaltarse la tolerancia. Habitación de distintos protistas al mismo veneno.	63
2. Elevación de la resistencia <i>in vivo</i> .—Los trabajos de N. VON JANCsó.	64
3. Otras hipótesis que intentan explicar la elevación de la resistencia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> por procesos producidos en las células de las poblaciones de protistas	65
a) Desaparición de la actividad de los receptores de las células...	65
b) Modificaciones de la actividad fermentativa.....	66
c) Selección de mutantes	71
d) La investigación del proceso como principio heurístico.....	72
4. Hipersensibilidad como fase previa a la elevación de la resistencia.	75
5. Interpretación de la resistencia de protistas frente a los venenos...	77
a) Las modificaciones persistentes de los protozoos.....	79
b) La existencia de alteraciones fijadas por la herencia inducidas de modo específico	82
c) La elevación de la resistencia de bacterias frente a sustancias tóxicas para ellas	85
La hipótesis de la adaptación de C. N. HINSHELWOOD, pág. 89.	
d) Los fenómenos de habituación en cultivos de células de animales de sangre caliente	95
CAPÍTULO III.—Apéndice.	
La inmunidad natural contra venenos no condicionada por antitoxinas.	98
BIBLIOGRAFÍA	103
ÍNDICE ALFABÉTICO DE MATERIAS	111

INTRODUCCION

Lo que el biólogo y el médico entienden bajo la designación de "inmunidad", no es, de ningún modo, un concepto de límites bien definidos. El matemático inglés WHITEHEAD, en el prólogo a una introducción suya al estudio de estas ciencias, sin embargo de exactitud máxima, expresa que el científico comparte con Humpty-Dumpty (1) el privilegio de coleccionar nombres que, a voluntad del que habla, adquieren las significaciones más diversas. Esta aguda crítica conviene por entero al empleo habitual de la expresión "inmunidad". Con todo, considerados desde puntos de vista de validez general, los fenómenos de inmunidad pueden clasificarse en dos grupos. Constituye la clave del primer grupo el hecho, conocido hace siglos, de que la supervivencia a una enfermedad infecciosa confiere al que la ha sufrido una protección firme y duradera contra una segunda infección de la misma especie. El grupo segundo está dominado por los resultados de la moderna investigación experimental, que puede resumirse en la afirmación de que la administración parenteral de ciertas sustancias (antígenos), formes o no, tiene como consecuencia la aparición en el torrente circulatorio de anticuerpos, que reaccionan de modo específico, dando lugar a una neutralización recíproca, con los antígenos a los que deben su formación. Por tanto, en la terminología en uso, por "inmunizar" también se significa que, por el tratamiento con antígenos, se intenta obtener un suero que contenga anticuerpos, independientemente de que éstos supongan una ventaja o un peligro para el organismo. Y este doble sentido no es la única

(1) Humpty-Dumpty es un personaje del cuento para niños de LEWIS CARROLL, *Through the looking-glass*. La niña Alicia opina en una conversación con Humpty-Dumpty: "That's a great deal to make one word mean." Y CARROLL, que también era matemático, hace que Humpty-Dumpty replique a la objeción: "When I make a word do a lot of work like that, I always pay it extra."

causa de la imposibilidad actual de hacer coincidir ambos grupos completamente; se ha observado que puede existir una inmunidad antiinfecciosa específica sin que se descubra en la sangre ningún anticuerpo, y que, a la inversa, después de pasar una enfermedad infecciosa o de vacunarse, pueden existir anticuerpos en la sangre sin que—según demuestra la experiencia epidemiológica o las pruebas directas—se reduzca la receptividad específica para el contagio.

A pesar de nuestra incapacidad actual de formular el concepto de inmunidad de modo tan definido que, en cada caso particular, resulte por sí mismo claro si hay que excluirlo como totalmente ajeno a los fenómenos de inmunidad o puede ponerse en relación estricta con ellos, hasta la fecha parece atrevido incluir en el marco de esta serie de monografías una dedicada a la *habituación a venenos no antigénicos*. Para justificarlo haremos preceder las consideraciones que siguen, al objeto propiamente dicho de la monografía.

La habituación a venenos, si se considera sin prejuicios, sólo es un caso particular de la regla general, según la cual el organismo responde a la segunda o a la reiterada actuación de un estímulo de modo distinto a como lo hizo la primera vez, influyendo en la modificación del efecto el intervalo transcurrido entre las excitaciones. Naturalmente, la modificación de la reacción del organismo por la repetición de un mismo estímulo puede deberse a distintas causas; es decir, poseer diversos mecanismos. Pero la cuestión que nos interesa es si en la participación de un anticuerpo hemos de ver un criterio que señale para tales modificaciones de la reacción una posición especial, definida de modo absoluto. Esta pregunta no puede contestarse afirmativamente, con seguridad.

En primer lugar, uno de los dos objetos que se comparan, la reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*, está lastrada con problemas insolubles en tantos y tan importantes puntos que ha de jugar un amplio papel la formación de hipótesis, que en todo tiempo se ha explotado abundantemente. A pesar de haber dedicado a ello un enorme esfuerzo, seguimos sin poder dar una respuesta satisfactoria a la formación y naturaleza del anticuerpo. La opinión de que los anticuerpos que circulan con la sangre de los animales inmunizados no son sino seroproteínas modificadas (globulinas inmunes), hoy nos parece tan bien fundada que rechazaríamos enérgicamente cualquier duda, como carente en absoluto de fundamento. Del mismo modo, nos sentimos autorizados para afirmar que los síntomas anafilácticos deben atribuirse, en último término, a una reacción antígeno-anticuerpo que transcurre *in vivo*. Pero todos los investigadores con experiencia coin-

ciden en admitir que no existe ningún paralelismo entre el contenido de anticuerpos en la sangre y la reactividad anafiláctica, ya que, en ocasiones, un animal posee gran cantidad de anticuerpos circulantes y, en cambio, no reacciona con el antígeno, mientras que, por el contrario, otros animales carecen de anticuerpos en sangre en cantidad apreciable y, sin embargo, mueren de choque agudo. Estas observaciones, así como la afirmación de que las hembras de cobayo sensibilizadas, después de haber desaparecido de su sangre los anticuerpos, siguen durante años transmitiendo por vía diaplacentaria anticuerpos procedentes de su sangre a las crías, de modo que éstas nacen en estado de anafilaxia pasiva, y el hecho de que un estado de anafilaxia existente no pueda eliminarse por un lavado a fondo de los vasos, nos llevan por último a opinar que, aparte de los anticuerpos circulantes en la sangre, debe existir otra forma o localización del anticuerpo que se caracterice por estar "fijo en la célula"; es decir, combinado a los tejidos del choque. No es este lugar para considerar los pros y contras de esta hipótesis. En todo caso, no está refutada definitivamente, y si en la certidumbre actual puede considerarse como una de las posibles explicaciones para muchos fenómenos, sin su auxilio incomprensibles, no está muy alejada de las observaciones sobre habituación a venenos que, naturalmente, deben fundarse en alteraciones de la reacción de las células sensibles a ellos.

Por otra parte, en los últimos años se han publicado trabajos experimentales que inician el puente entre la inmunización por antígenos tóxicos y la habituación a venenos no antigénicos.

En primer lugar, citaremos las investigaciones de S. B. HOOKER y W. C. BOYD (1940). Se fundan en que las sustancias diazotadas de estructura química sencilla se combinan fácilmente con proteínas anti-génicas, dando productos de copulación. Estos productos de copulación, cuando se utilizan como antígenos inmunizantes—no siempre, pero con suficiente frecuencia para poder reproducir los ensayos—, rinden antisueros cuya especificidad está determinada por la proteína sólo en grado subordinado, y predominantemente por la sustancia sencilla copulada a la proteína. Por ejemplo, si se inmunizan conejos con un antígeno conjugado constituido por ácido arsanílico diazotado y suero de caballo, se obtiene un antisuero que da floculaciones específicas con el ácido arsanílico diazotado; precipitaciones que en ocasiones pueden inhibirse específicamente por ácido arsanílico sin diazotar. Sabemos que tanto la floculación específica como la inhibición específica de la floculación se deben a una combinación (saturación) del anticuerpo, y que este mismo proceso es precisamente el que oca-

signa la neutralización del efecto venenoso de las toxinas bacterianas por las antitoxinas. Apoyándose en este hecho, HOOKER y BOYD obtuvieron, a partir de la mononitroestricnina y dinitroestricnina, los correspondientes derivados mono y diaminados, que diazotaron con las cantidades suficientes de NaNO_2 para constituir grupos aminos; de este modo lograron la copulación con suero de caballo, y con el producto de la copulación inmunizaron conejos durante cuatro semanas. Los antisueros obtenidos, ensayados con caseína-monoaminoestricnina y con caseína-diaminoestricnina, ofrecieron, en contados casos, reacciones de precipitinas débilmente positivas. Después se trataron los mismos conejos con un antígeno conjugado obtenido de monoaminoestricnina y de la hemocianina de la sangre del *Limulus polyphemus*. A continuación se observó que los sueros (ensayados con caseína-azoeestricnina) floculan más energicamente, y las floculaciones pueden ser inhibidas por el alcaloide mismo, así como por algunos derivados suyos aminados, nitrados y metoxilados; pero no por la morfina, quinina, triptófano, etc. Las reacciones de inhibición son, por tanto, específicas para la estricnina (1).

No puede, pues, dudarse de que HOOKER y BOYD, por el artificio de utilizar un antígeno conjugado en el que la estricnina ejerce la función de hapteno determinante de la especificidad, han conseguido obtener un anticuerpo específico para la estricnina. Sin embargo, resulta imposible neutralizar la acción de la estricnina en el experimento con animales, lo que se atribuye a tres circunstancias. En primer lugar, a la enorme desproporción entre el número de las moléculas de anticuerpo por mililitro de suero inmune y el número de moléculas de estricnina contenidas en la dosis mínima del alcaloide; para los mejores sueros de HOOKER y BOYD, los autores calculan la proporción 1:59, de modo que hay que excluir, por razones cuantitativas, una saturación equimolecular. En segundo lugar, porque para conseguir una "verdadera" neutralización es necesario que en el antígeno conjugado utilizado para la inmunización, los grupos determinantes de la toxicidad y los de la especificidad sean idénticos, lo que hay que demostrar previamente. Y, en tercer lugar, es probable que los antisueros no puedan actuar terapéuticamente frente a un veneno tan difusible y de acción tan rápida como la estricnina. Es fácil, pues, explicarse que, a pesar de la obtención de anticuerpos específicos para

(1) Siguiendo el mismo método de la transformación en azoproteínas, QU. MINGOLA y E. SBOCCA (1941) consiguieron obtener anticuerpos contra la estricnina y contra la morfina.

la estricnina, no se haya conseguido ninguna neutralización de la acción de la estricnina. Pero existe también la posibilidad de que sueros inmunes de alto valor carezcan de efecto neutralizante. Hasta la fecha no se han logrado resultados alentadores en las tentativas de obtener, por inmunización con proteínas a las que se ha copulado una sustancia con actividad fisiológica, antisueros capaces de neutralizar ésta *in vivo*; R. DOERR (1948, págs. 266-71) revisa el estado de esta cuestión. HOOKER y BOYD consideran, sin embargo, probable que puedan obtenerse antisueros que permitan actuar antagónicamente, al menos en la aplicación profiláctica, contra la acción de ciertos alcaloides. Pero los antígenos conjugados obtenidos de nitrosomorfina diazotada y ovalbúmina han resultado totalmente ineficaces, y parece que se ha abandonado el camino que se calificó de tan prometedor, puesto que W. C. BOYD, en la segunda edición, aparecida en 1947, de su obra *Fundamentals of Immunology*, sólo menciona el experimento con estricnina.

Como autores anteriores (recuérdese el suero antimorfina de HIRSCHLAFF), HOOKER y BOYD estaban influidos por el descubrimiento de E. v. BEHRING, de que los venenos bacterianos, tan sumamente activos, pierden efectivamente su efecto venenoso *in vivo* e *in vitro* por sus anticuerpos, las antitoxinas. En este paradigma se inspira también J. LOISELEUR (1946 a, b, c, d), si bien este autor no considera necesario, para obtener un antisuero neutralizador de un veneno no antigénico, copular éste a una proteína antigénica, porque estaba convencido de que pueden producirse anticuerpos por la inmunización directa con una serie de sustancias orgánicas de peso molecular muy bajo que hasta ahora no se habían considerado antígenos. Los antisueros obtenidos de este modo no dan precipitados *in vitro* con las sustancias utilizadas como antígenos; pero su contenido de anticuerpos se descubre en que al añadir la cantidad óptima del antígeno se produce una elevación considerable y estrictamente específica de la viscosidad de la mezcla de la reacción, acompañada de un descenso del índice de refracción.

No resultaron válidas todas las sustancias orgánicas investigadas por LOISELEUR; pero entre las idóneas figura la morfina y el alcohol etílico, por lo que los resultados de sus investigaciones están en relación con el fenómeno de la habituación a venenos, relación que LOISELEUR apreció en seguida y que ha profundizado después.

Para obtener resultado positivo por la inmunización con sustancias de peso molecular bajo, deben ser administradas, por lo menos dos veces al día y durante diez o doce días, en cantidades lo más elevadas

posible, de modo que la sangre, según expresión de LOISELEUR, se inunde de ellas. Cuando estas sustancias, como el alcohol o la morfina, sean tóxicas para el animal de experimentación (en los experimentos fundamentales se emplearon solamente conejos), según LOISELEUR debe comenzarse por pequeñas dosis y aumentar sistemáticamente la cantidad que se inyecta a diario, proceso que se compensa por la prolongación de la duración de la inmunidad a varias semanas. No volveremos a considerar el fundamento teórico de estas prescripciones porque no posee importancia fundamental para el tema de esta monografía; el lector que le interese puede consultar R. DOERR (1949, páginas 9-17). Por el contrario, el modo de inmunizar recomendado para sustancias tóxicas se asemeja en dos puntos al comportamiento de los alcohólicos y morfínómanos, que toman el veneno diariamente y en cantidad creciente.

En general, los anticuerpos producidos por sustancias orgánicas de bajo peso molecular duran poco en el torrente circulatorio, a pesar de que, como los producidos por antígenos proteicos, son también globulinas del plasma sanguíneo dotadas de afinidades específicas. Pero se han observado excepciones a esta regla, y a ella deben pertenecer también los anticuerpos desarrollados en las intoxicaciones crónicas con alcohol o morfina. J. LOISELEUR y M. LÉVY (1947) admiten que en el hombre, tratado del mismo modo, deben desarrollarse también tales anticuerpos; por ello los autores citados pretenden ver en la presencia permanente de tales globulinas inmunes capaces de fijar su antígeno una de las causas del vicio; es decir, una explicación serológica de la necesidad de alcohólicos y morfínómanos de volver a tomar los venenos. Evidentemente, esta concepción se funda en que los venenos se combinan parcialmente con los anticuerpos, y que por ello no consiguen producir su efecto normal con la duración e intensidad deseada por el que padece el vicio. Lo anterior equivale a afirmar implícitamente que la morfina o el alcohol, mientras que están combinados con los anticuerpos, no pueden ejercer las acciones que despliegan en estado libre, análogamente a las toxinas bacterianas que, al combinarse con las anti toxinas específicas, quedan inhábiles para actuar. Sin embargo, esta neutralización o inactivación no es una consecuencia necesaria de las reacciones antígeno-anticuerpo. Se conocen enzimas que conservan sus funciones fermentativas cuando están combinados con sus anticuerpos. Por ello era de esperar que LOISELEUR, mediante experimentos convenientes, hubiera intentado poner en claro si se conserva o se pierde la actividad farmacodinámica de la morfina cuando se mezcla antisuero con una cantidad ópti-

ma del alcaloide. Sin embargo, este punto no se discute en las comunicaciones de LOISELEUR que conocemos. Parece ser que LOISELEUR tampoco se ha ocupado de qué estabilidad posean las combinaciones de sustancias tóxicas de peso molecular bajo con el correspondiente anticuerpo. Como es sabido, los complejos antígeno-anticuerpo pueden desdoblarse en sus componentes, y existen casos (como en las hemaglutininas de productos infecciosos del tipo de los virus) en que la disociación se produce espontáneamente y además sin necesidad de alterar el medio en que esté suspendido el complejo antígeno-anticuerpo. Indudablemente, la estabilidad de las combinaciones posee singular importancia en relación con el mecanismo serológico postulado por LOISELEUR para explicar el abuso crónico de alcohol o de morfina.

Por el contrario, LOISELEUR, inducido por su convencimiento de la existencia de globulinas inmunes (anticuerpos) contra el alcohol etílico, ha planteado un experimento que parece notable desde varios puntos de vista y que, también por razones metodológicas, debemos recoger en la introducción de esta monografía.

J. LOISELEUR y M. PETIT (1947) colocaron ratones blancos machos, pertenecientes a una línea pura y adultos (con excepción de los animales de una prueba parcial), en jaulas, cada una de las cuales contenía cinco ejemplares. Los ratones recibieron una alimentación seca, y, como bebida, al principio, únicamente agua hasta que el consumo del líquido en veinticuatro horas—que podía leerse en depósitos graduados—tomaba valores aproximadamente constantes. A continuación comenzó la prueba propiamente dicha, que consistió en ofrecer a los animales de cada jaula tres recipientes para la satisfacción de sus necesidades de líquido: uno que contenía agua, otro agua con el 10 por 10 de alcohol etílico y el tercero agua con el 10 por 100 de alcohol metílico. Desde el primer día los animales consumieron $1/3$ del líquido total del recipiente con alcohol etílico, y entre los días ocho y treinta y cinco, el consumo de alcohol diluido sobrepasó al de agua pura, hasta que, finalmente, los ratones dejaron casi de beber agua, y consumieron exclusivamente alcohol diluido. El alcohol metílico sólo se tuvo en cuenta los primeros días, pues los ratones aprendieron pronto a distinguir las dos clases de alcohol, y el consumo de alcohol metílico se redujo a un mínimo. La mortalidad de los ratones no resultó especialmente elevada (14 por 100), ni se observó influencia nociva sobre el estado general. En un ensayo antes mencionado, en que se utilizaron ratones jóvenes (de dos a tres meses), los animales crecieron normalmente. Si los ratones se matan a los cien días de

experimentación, el examen microscópico e histológico de los órganos no revela alteraciones patológicas. Los autores deducen de estas observaciones que los ratones poseen una inclinación al alcoholismo que no combaten y que son capaces de establecer rápidamente la diagnosis diferencial entre el alcohol etílico y el metílico.

Este experimento difiere de los otros muchos efectuados también en animales para estudiar la posibilidad de la habituación a sustancias tóxicas, en que el veneno no se les administra a la fuerza, sino que se presupone que los animales de experimentación poseen suficiente capacidad para distinguir el comportamiento que les conviene seguir y que evitarán totalmente consumir el veneno. Sin embargo, se registra inesperadamente el comportamiento contrario. Después de leer la breve comunicación de LOISELEUR y PETIT se entra en deseo de repetir tales experimentos y extenderlos a otras sustancias. Pues en ella se aprecia con cuánta claridad un experimento en animales puede ofrecer un fenómeno que tan gran papel juega en la habituación del hombre a estupefacientes: el desarrollo del vicio, la necesidad de renovar continuamente la acción del veneno.

Se entiende fácilmente que en todos los casos de elevación de la resistencia contra sustancias tóxicas por la actuación sucesiva de éstas, se recurra a la inmunidad antitóxica activa y que se intente, de los más distintos modos, establecer una relación con este paradigma. En cuanto al grado de resistencia que se alcanza, la inmunidad antitóxica constituye una cima. En tanto que la investigación inmunológica no conceda ningún lugar a los resultados de la investigación de LOISELEUR ni a sus interpretaciones hipotéticas, está, naturalmente, justificada la objeción de que la inmunidad antitóxica activa se funda en la formación de anticuerpos neutralizantes, mientras que no se produce este hecho o no se puede demostrar con seguridad en otras análogas elevaciones de resistencia. El hecho de que los tejidos sensibles al veneno participen en la creación de la inmunidad antitóxica originada por estimulaciones repetidas de toxinas bacterianas, no resulta más comprensible para los inmunólogos actuales que lo era para los contemporáneos de PAUL EHRLICH, que consideraban las antitoxinas como receptores lanzados a la sangre por las células sensibles al veneno. Hoy se considera cierto que las antitoxinas se forman en tejidos o células del organismo de los mamíferos, que están alejados de los puntos de ataque de las toxinas, de modo que se ha privado de base al concepto de una reacción de defensa conveniente. Sin embargo, en 1893, E. VON BEHRING ofreció la prueba de que las células sensibles a la toxina deben participar de un modo u otro en la creación

de la inmunidad antitóxica. Observó que caballos, ovejas y cabras, en el curso de la inmunización con toxina diftérica o tetánica, modifican con frecuencia su capacidad de reacción contra estos venenos, de un modo tal, que dosis que no alcanzan sino a 1/1.000 ó 1/10.000 de las cantidades que carecen de efecto sobre los animales normales, provocan en ellos fuertes reacciones, y así estos animales pueden morir por la centésima parte de la dosis que, en otro caso, no les hubiera ocasionado más que fenómenos leves. Estas observaciones fueron confirmadas por varios autores y hechas extensivas a animales de experimentación de menor tamaño. En este caso, la repetición de la acción de la toxina no conduce a la inmunidad, sino a la hipersensibilidad; es importante señalar que existe la certeza de que se trata de una modificación de la capacidad de reacción específica de las células sensibles a la toxina; certeza que resulta de los siguientes hechos:

1. La hipersensibilidad no puede tener origen humoral, puesto que no se puede transmitir con el suero;
2. Los fenómenos patológicos han de deberse a reacciones de las células sensibles al veneno, puesto que son idénticos a los síntomas que la toxina ejerce en animales normales, no tratados previamente, cuando se inyecta en dosis mayores; se trata, pues, de una exaltación meramente cuantitativa de la sensibilidad normal de determinadas células o tejidos.

Existen también varias relaciones entre la inmunidad contra toxinas antigénicas y la tolerancia adquirida contra los venenos no antigénicos, relaciones que encuentran su expresión en resultados experimentales y en hipótesis aún en tela de juicio, y parece justificado tratar la habituación a venenos de bajo peso molecular junto al capítulo especial de la inmunidad antitóxica.

Tal vez sorprenda que en nuestra exposición comencemos por los fenómenos de habituación en los organismos superiores y que estudiemos en segundo lugar la habituación de los organismos unicelulares (protozoos, bacterias). Si nos desviamos de la costumbre de ascender de las organizaciones más sencillas a las más complicadas, es por estar convencidos de que, en este campo especial, los problemas se simplifican cuando las observaciones y experimentos se efectúan en organismos muy desarrollados; en este caso se trabaja con individuos, y las células que participan en las modificaciones del modo de reaccionar persisten en su mayor parte, como les sucede a las células nerviosas de los órganos nerviosos centrales durante toda la vida del individuo. En los protistas, por el contrario, como objeto de la observación y

de la experimentación se nos ofrece una serie de individuos de vida breve que se alteran continuamente, y en los intentos de referir los fenómenos observados en tales poblaciones a los procesos que suceden en el individuo, la formación de hipótesis encuentra excesivo campo, como se verá en la segunda parte de esta monografía.

Todo biólogo sabe que ningún organismo vivo podría persistir durante mucho tiempo si no poseyera la capacidad de adaptarse a las circunstancias siempre cambiantes de su medio. La capacidad de adaptación no sólo es una condición necesaria de la vida individual, sino que además no puede prescindirse de considerarla al estudiar el proceso de una serie de fenómenos; como, por ejemplo, el del desarrollo de las relaciones específicas entre parásitos y simbiosis con sus huéspedes. La palabra "adaptación" y el concepto que encierra están en la lista negra de muchos autores; se evitan para no ser tachados de adeptos a la teoría de LAMARCK. A este respecto, ТН. DOBZHANSKY (1941) se ha expresado como sigue en la segunda edición de su obra *Genetics and the Origin of Species*: "La herencia de las propiedades adquiridas (un reflejo de alteraciones del fenotipo en la estructura del genotipo) no se producen de modo visible. Los pocos que aun creen en tales posibilidades, epígonos del lamarckismo, no pueden demostrar sus convicciones; en todo caso sus especulaciones se han demostrado infecundas como hipótesis de trabajo. Pero, desgraciadamente, los investigadores de la herencia hemos erigido en la cima de la polémica contra el lamarckismo algunas afirmaciones que no contribuyen a esclarecer las circunstancias; a ella pertenece la afirmación de que el genotipo no se deja influir por el medio. Es cierto que el genotipo intenta reproducir su ser en todos los medios en los que su soporte pueda vivir. A pesar de ello deben tener lugar alteraciones genotípicas en las que el medio desempeñe un papel, al menos como mecanismo inhibitor. Aún más importante resulta que todo genotipo sea el producto de un proceso de desarrollo que se extiende a largos períodos durante los cuales el medio participa en gran medida por las selecciones naturales. La estructura del genotipo y, por tanto, el tipo de alteraciones que él puede condicionar está condicionado en último término por el medio. Ahora bien, este medio determinante no es sólo el que existe en el momento, sino la suma de los ambientes a que ha estado sometido el organismo en el curso de su filogénesis." Es cierto que DOBZHANSKY admite que sólo dos son los principios fundamentales que presiden la desaparición y la persistencia de los seres vivos; por una parte, como principio conservador, la estabilidad del genotipo, y, por la otra, actuando contra

la estabilidad, el fenómeno de la mutación, único que permite un desenvolvimiento. Sin embargo, este autor concede mucha más importancia que otros genéticos a las influencias de medio ambiente y, en particular, establece una diferencia fundamental entre la acción presente del medio y las influencias del medio siempre cambiantes y su suma durante los eones de la filogénesis de los organismos. Las adaptaciones de organismos a sustancias tóxicas son alteraciones que se producen a consecuencia de acciones breves del agente perjudicial, son propiedades adquiridas que, según las teorías dominantes, no se transmiten a los descendientes. Así, pues, por el tema mismo, no hay razón para entrar en problemas de la teoría de la herencia. Sin embargo, se ha señalado que, en los protistas, la resistencia adquirida frente a un veneno puede persistir durante varias generaciones, aunque se haya eliminado el agente tóxico del medio en que los protistas vivan. Como este hecho está en contradicción con la doctrina que admite que la estabilidad y la variabilidad que se fija por herencia sólo están regidas por dos fuerzas, herencia y mutación, se ha procedido, en obsequio de la teoría, a negar en lo posible la adaptación, esforzándose en interpretarla como una selección natural de mutantes preexistentes. Esta incursión en la genética sirva al lector de orientación previa; para la parte segunda de esta monografía se reservan datos más exactos y consideraciones más precisas.

CAPÍTULO PRIMERO

LOS FENOMENOS DE HABITUACION EN LOS ORGANISMOS SUPERIORES

Al hablar de "habituación" es casi forzoso pensar, en primer lugar, en la morfinomanía. De hecho, la morfinomanía (o en el abuso del opio) constituye el caso de habituación conocido de más antiguo y el que ha estimulado más intensamente la investigación en el campo de la habituación. Constituye un fenómeno de habituación, por ejemplo, el hecho de que los morfinómanos en grado elevado puedan recibir cantidades que son múltiples altos de la dosis mortal para un hombre normal, sin que se observe daño inmediato para su organismo; ni siquiera suelen ponerse de manifiesto los efectos somáticos, típicos de la morfina. El morfinómano regula su ración de morfina de modo que le produzca con la intensidad deseada las acciones que encuentra psíquicamente agradables, sin las cuales la vida deja de parecerle digna de vivirse. En ocasiones, además, no aparecen o sólo se manifiestan débilmente las acciones somáticas características de la morfina en que se funda su empleo terapéutico (la acción analgésica, la retardadora de la respiración y calmante de la tos y la sedante sobre el intestino), a pesar de que se acusan en el hombre normal a dosis mucho menores. Para estas últimas acciones existe también "habituación", con cuyo nombre queremos designar, con JOEL (1923), el estado en que, para conseguir un determinado efecto, se necesita una dosis mayor que la normal. La dosis requerida en estado de habituación para producir un efecto puede llegar a ser, en ocasiones, tan elevada que dicho efecto, prácticamente, no pueda ya conseguirse. Este caso se da cuando el organismo pudiera perecer por una pequeña dosis a consecuencia de la cantidad recibida previamente.

Un fenómeno totalmente distinto de la "habituación" que acabamos de describir es el denominado "vicio" o "manía", que consiste en una necesidad exaltada patológicamente de una acción que, en general, se produce sobre funciones psíquicas. *Habituación* y *vicio* son,

por consiguiente, cosas enteramente distintas y no guardan entre sí relaciones incondicionales. Existen estados de sumo enviciamiento que van acompañados de una habituación general también muy acusada (por ejemplo, en la morfínomanía), estados de enviciamiento grande acompañados de escasa habituación general (por ejemplo, en la cocainomanía) y estados de vicio sin habituación apreciable (por ejemplo, en el vicio del haxis); a la inversa, existen bastantes ejemplos de sustancias que ofrecen el fenómeno de la habituación sin que provoquen simultáneamente una afición viciosa a ellas (cafeína, histamina y otros).

DIFERENCIA ENTRE TAQUIFILAXIA Y HABITUACION

En la introducción se expuso ya con bastante claridad que bajo el nombre de habituación debe entenderse principalmente una "disminución de la sensibilidad". En la literatura dentro de este concepto amplio (no siempre empleado correctamente) se distingue entre la denominada *taquifilaxia* y la *habituación* en sentido estricto. Bajo *taquifilaxia* se entiende una pérdida de sensibilidad que se desarrolla en un tiempo muy breve (en ocasiones, en pocos minutos). Por la velocidad con que se origina pudiera tal vez situarse en la misma línea que la desensibilización aguada, tal como aparece, por ejemplo, en los experimentos de anafilaxia. Pero se diferencia en algunos puntos importantes de una desensibilización en el sentido inmunológico. Por ejemplo, porque un organismo puede mostrar taquifilaxia para una sustancia, aunque sea la primera vez que se ha puesto en contacto con ella. Puede asegurarse que se trata de una acción primaria cuando se observa una acción taquifiláctica al administrar a perros sustancias sintéticas, por ejemplo, el éster etílico del ácido 1-metil-4-fenil-piperidin-4-carbónico (Dolantina) [STRIDEMAN y JOHNSON (1948)]. La taquifilaxia y la desensibilización inmunológica también se diferencian en que la mayor parte de las sustancias conocidas hasta la fecha como taquifilácticas no sensibilizan en el sentido inmunológico. Y finalmente constituye una tercera diferencia esencial que el estado de disminución de la sensibilidad propio de la taquifilaxia se sostenga muy poco tiempo (en general pocas horas). Para distinguirla de esta "habituación aguada" o taquifilaxia (1), en la literatura se designa como *habituación*

(1) Más adelante, para mejor diferenciación, nos detendremos en la palabra "taquifilaxia".

la forma de sensibilidad reducida que se desarrolla paulatinamente en el curso de una administración repetida a intervalos regulares (como la sabida habituación a los estupeficientes).

Según las consideraciones anteriores, la taquifilaxia y la habituación no se distinguen sino por el tiempo que requieren para originarse. Por tanto, parece que decidir en cada caso concreto si se trata de taquifilaxia o de habituación, es una cuestión de mera apreciación cuantitativa. Pero, sin embargo, existen entre una y otra diferencias importantes que nos aconsejan a tratar por separado ambos fenómenos. En la taquifilaxia, por ejemplo, es característico que los puntos de ataque responsables de la acción correspondiente se mantengan ocupados por la sustancia activa misma, circunstancia que no es obligada para la habituación. Creemos que precisamente por una contraposición entre taquifilaxia y habituación pueden comprenderse en su conjunto los fenómenos de habituación.

TAQUIFILAXIA

Descripción del fenómeno.

En el año 1911 CHAMPY y GLEY mostraron que la segunda dosis de una sustancia, que en caso contrario actúa enérgicamente, puede quedar sin efecto cuando la primera dosis se ha recibido poco tiempo antes. Por ejemplo, si a un conejo se le administra por vía intravenosa un extracto de cuerpos amarillos de bovino en una dosis que actúe manifiestamente de modo tóxico, provocando una vasodilatación aguda general, y, un cuarto de hora después, una vez que, al parecer, ha remitido la acción de la primera dosis, vuelve a inyectársele una segunda mucho mayor, ésta no ejerce efectos perceptibles. Dieron a este fenómeno el nombre de "taquifilaxia".

A continuación, de distintos lugares llegaron informes de fenómenos semejantes que, en parte, tenían que ver con otras sustancias y, en parte, con otros animales de experimentación. CUSHNY (1913), BUCHER (1944) mencionan, por ejemplo, que la acción de una inyección intravenosa de morfina consistente en reducir la frecuencia respiratoria, se hace cada vez más débil y finalmente se extingue totalmente si se suceden a breves intervalos las dosis sucesivas; los conejos, procediendo de este modo, se hacen, en el transcurso de veinte minutos, tan resistentes a la morfina, que pueden soportar sin consecuencias unas cantidades de morfina cuya centésima parte hubieran

provocado normalmente la muerte del animal. KOCHMANN (1921), al líquido ventricular del corazón aislado y latiendo de rana temporaria invernante le añadió cocaína hasta conseguir una concentración N/1.500; a esta concentración se produce una manifiesta acción depresiva que se traduce en reducción de la frecuencia y amplitud de los latidos; pasado cierto tiempo, los corazones se recuperan espontáneamente sin que se haya cambiado el líquido ventricular; si, en este momento, vuelve a añadirse cocaína, no se produce la enérgica consecuencia de la anterior adición. El mismo KOCHMANN analizó este "fenómeno de recuperación", encontrando que puede atribuirse, en parte, a una destrucción parcial de la cocaína, pero también, en parte, a un desarrollo agudo de resistencia del corazón. Como causa de este desarrollo considera la posibilidad de que los puntos atacables por la cocaína estén ocupados por los productos inactivos resultantes de la demolición del alcaloide, y que por ello sea más débil el efecto de la segunda adición. En 1926 CHEN y MEEK observaron, en perros, que la acción elevadora de la presión sanguínea provocada por la efedrina (ca. 0,003 g/kg.) disminuye rápidamente al repetir las administraciones intravenosas. Las propiedades taquifilácticas de la efedrina y de otras fenilalquilaminas simpaticomiméticas se han confirmado repetidamente en distintos animales [CHEN (1928), SCHAUMANN (1931), KIESE (1935), BURN (1946) y otros], de modo que puede decirse que los problemas de taquifilaxia se han estudiado después de modo preferente en la efedrina. En 1928 SCHMIDT y LEVINSTON (1928, 1933) observaron que la reducción aguda de la presión sanguínea que normalmente provoca en perros o gatos una inyección intravenosa de morfina (por ejemplo, de 0,001 g/kg.), no se observa si, dentro de los veinte minutos anteriores, se han administrado al menos dos de tales inyecciones. En este caso dosis, incluso muy grandes (hasta de 0,05 g/kg.), no alcanzan a provocar la reducción de la presión sanguínea. Los autores designan este fenómeno como "tolerancia aguda". Según STRAUB y SCHILD (1933), también muestra taquifilaxia la acción inhibitoria de la morfina sobre el peristaltismo del intestino grueso del cobayo.

De otras muchas sustancias se ha señalado que algunas de sus acciones se debilitan si se pretende provocarlas a cortos intervalos. Las circunstancias inherentes hacen opinar que estas formas de debilitamiento del efecto deben también incluirse en el fenómeno que designamos como taquifilaxia. EICHLER y KILLIAN (1931) describen, por ejemplo, que al inyectar repetidamente histamina al conejo se debilitan cada vez más los efectos tóxicos. Lo mismo puede decirse

de la acción elevadora de la presión sanguínea que la nicotina ejerce sobre el gato [DIXON y LEE (1912)]. La polivinilpirrolidona (Peristona) puede provocar en el perro, como notable efecto, un estado semejante al del choque; pues bien, una segunda inyección administrada poco después de la primera resulta apreciablemente menos peligrosa [LOUBATIERES (1948)]. El ácido ciclohexenil-etil-barbitúrico, cuando se inyecta por primera vez a perros, ejerce un manifiesto efecto antidiurético y, en cambio, la segunda inyección carece de efecto cuando se administra muy poco después de la primera, dentro de un intervalo tan breve que debe admitirse que la primera dosis no se ha eliminado aún del organismo [BONSMANN (1933)]. El mismo BONSMANN ha observado también que sustancias de constitución química semejante y de acción farmacológica de tipo análogo pueden sustituirse mutuamente en la actividad taquifiláctica; por ejemplo, después de una inyección de ácido ciclohexenil-etil-barbitúrico carece de efecto una segunda de ácido fenil-etil-barbitúrico. Esta posibilidad de reemplazarse mutuamente, que pudiera designarse por algo así como "taquifilaxia inespecífica", ha sido señalada también por otros autores, así por GAYSBÖCK (1911) en las sustancias colinérgicas, pilocarpina y muscarina, y después, y ante todo, por EICHLER (1937), en las fenilalquilaminas taquifilácticas. Hace poco, EMMELIN y FELDBERG (1948) han señalado el hecho de que sustancias que se suponen propias del organismo pueden actuar también de modo taquifiláctico, por ejemplo el ácido adenosintrifosfórico en su acción de elevar la presión sanguínea en gatos.

Como resulta de los datos aducidos, el fenómeno de la taquifilaxia aparece ya al cabo de un cuarto de hora. De no mantenerse por la administración repetida de inyecciones periódicas de la sustancia taquifiláctica a intervalos cortos, suele remitir, en general, al cabo de cuatro a veinticuatro horas. EICHLER (1937) determinó exactamente el período que tarda en desaparecer en el gato la taquifilaxia respecto a la acción sobre la circulación de la β -(*p*-oxifenil)-isopropil-metilamina (Veritol), y encontró un valor de unas cinco horas.

Para resumir en una fórmula breve el concepto de taquifilaxia habríamos de decir: designamos como taquifilaxia el fenómeno que se observa cuando al administrar una sustancia en repetidas inyecciones separadas entre sí por breves intervalos, los efectos de ella (o los de inyecciones de una sustancia análoga) van siendo cada vez más débiles, aunque los de la inyección interior, al parecer, hayan ya remitido.

Se observan la circular de la sustancia en el organismo y se ven debiles por taquifilaxia cuando se administra repetidas veces a intervalos cortos.

Mecanismo de la acción.

La mayoría de los autores interpretan el mecanismo de la taquifilaxia por lo que denominan "bloqueo de receptores". Se admite que desde la inyección anterior están ocupados, en parte o en su totalidad, los puntos de ataque o receptores que permiten actuar la sustancia correspondiente, y, por ello, al administrar la nueva dosis, ésta no encuentra receptores disponibles—o están en corto número—, y como consecuencia, el efecto es débil o nulo. SCHAUMANN (1931) fué el primero que planteó de este modo la teoría que posteriormente ha sido defendida por GADDUM y KWIATKOWSKI (1938), por MALORNY y ORZECOWSKI (1940) y recientemente, en especial, por WINDER, ANDERSON y PARKE (1948). La teoría puede apoyarse en las observaciones y consideraciones siguientes:

CURTIS, en 1929, observó que la elevación de la presión sanguínea causada por la adrenalina (5 y por kg.) resulta manifiestamente más débil después de una administración intravenosa de 0,03 g/kg. de efedrina. Otros autores han efectuado observaciones análogas de reducción de la actividad de la adrenalina por un tratamiento previo con grandes dosis de fenilalquilaminas [REINITZ (1929), FINKLEMAN (1930), ORZECOWSKI, GRONEMEYER y MALORNY (1940) y otros]. Lo notable de estas observaciones es que pueda hacerse inactiva por un tratamiento previo adecuado con una fenilalquilamina una sustancia activa propia del organismo, como es la adrenalina, que por sí misma no crea taquifilaxia y que (como GLEY (1911) señala) sería incluso incomprensible que pudiera actuar taquifilácticamente. El fenómeno, sin embargo, se explica sin dificultad por la teoría del bloqueo de receptores. Entre las fenilalquilaminas y la adrenalina existen semejanzas químicas y, ante todo, considerables analogías funcionales. Puede admitirse, pues, que los puntos del organismo sobre los que actúan unas y otra son tan semejantes que, por ejemplo, el receptor para una determinada fenilalquilamina posee también cierta afinidad para la adrenalina, y viceversa. Así se explica que grandes dosis de fenilalquilamina adecuada puedan ocupar en mayor o menor proporción los receptores de la adrenalina, con la consecuencia que después la adrenalina actúe menos intensamente.

La teoría ha recibido también el apoyo esencial de otros experimentos de tipo análogo. WINDER y colaboradores (1948) basan su razonamiento en la hipótesis de que, en general, el aumento de actividad de una sustancia a consecuencia de una elevación de las dosis

se debe a una variabilidad natural de los receptores responsables. Las pequeñas concentraciones de un fármaco ocuparían, pues, primeramente, unos pocos receptores especialmente ávidos. Según ello, por la administración de pequeñas cantidades de una fenilalquilamina apropiada sería posible ocupar precisamente sólo estos receptores de la adrenalina poco activos. Si, en este momento, se inyecta la adrenalina misma, sólo se encuentran en disposición de reaccionar con ella los numerosos receptores activos, puesto que la fenilalquilamina inyectada previamente saturó precisamente los muy ávidos, pero menos activos. La adrenalina, por ello, despliega en este momento una fuerte actividad que, en ocasiones, puede demostrarse experimentalmente. En efecto, existen distintas observaciones que permiten considerar que es correcta esta opinión teórica. Así, REINITZ (1929), SCHAUMANN (1928, 1931) y otros autores han observado que pequeñas cantidades de fenilalquilaminas con acción taquifiláctica exaltan la sensibilidad para la adrenalina, mientras que grandes dosis de ellas ejercen el efecto contrario. Estas observaciones, aparentemente contradictorias, se explican de modo satisfactorio por la teoría del bloqueo de receptores.

Pueden aducirse aún otras observaciones diversas que, aunque no de modo tan convincente como las citadas, también parece que apoyan la teoría del bloqueo de los receptores. Si la teoría fuera cierta, en el momento en que la inyección de una sustancia taquifiláctica resulta inoperante, la sustancia de la inyección anterior debe seguir combinada a los receptores y, además, en forma que continúa siendo activa. Para comprobar si este postulado se cumple efectivamente, puede intentarse la comparación entre las dosis y el momento en que se administran con la capacidad de eliminación por el organismo de la sustancia correspondiente. Se sabe [JACOBSEN y GAD (1940)], por ejemplo, que la β -fenilisopropilamina, sustancia que actúa de modo taquifiláctico en el conejo, a los treinta minutos de administrarse por vía intravenosa persiste en el organismo del conejo al menos en un 50 por 100 de la cantidad inyectada. Si se tienen en cuenta las pérdidas del proceso de trabajo y especialmente las que hayan podido producirse durante la renovación del producto, puede opinarse que debe existir, en realidad, aún más del 50 por 100 de la sustancia. Otros balances efectuados con fenilisopropilaminas [RICHTER (1938), BEYER y SKINNER (1940)] señalan también que estas sustancias (en comparación, por ejemplo, con la adrenalina de actividad análoga) se eliminan con relativa lentitud. Por consiguiente, y dado que la taquifilaxia se desarrolla al cabo de pocos minutos, en el momento de la reinyección

inactiva dichas sustancias deben persistir en gran proporción en el organismo. Experimentos como los de MCEWEN, HARRISON y IVY (1939) demuestran que la proporción entre las cantidades administradas y las eliminadas—esto es, más estrictamente, la concentración de la sustancia *existente* en el organismo y concretamente en los receptores—resulta decisiva para la taquifilaxia. Dichos autores, al estudiar el efecto elevador de la presión sanguínea ejercido por la renina, señalan que la taquifilaxia es tanto más acusada cuanto más rápidamente se sucedan las inyecciones “taquifilactizantes”. Y RIETSCHEL (1939) ha observado en gatos una dependencia de dosis análoga entre los componentes elevadores de la presión sanguínea de la efedrina y de la β -(p-oxifenil)-isopropilmetilamina, ya que la taquifilaxia aparece tanto más claramente cuanto mayores sean las dosis administradas en las inyecciones aisladas.

No puede admitirse que la sustancia taquifiláctica, aunque en el momento de la nueva inyección, inactiva, persista en el organismo, no esté, sin embargo, anclada en su receptor. Dadas nuestras actuales concepciones de los receptores [véase CLARK (1937)], sólo podría admitirse tal hecho si se hubieran alterado la sustancia o el receptor. Ya hemos considerado que lo primero no sucede (véase literatura en JACOBSEN). De los experimentos de REINITZ (1929), ORZECZOWSKI, GRONEMEYER y MALORNY (1940), parece deducirse que los receptores se conservan también inalterados. Estos autores han provocado taquifilaxia, *in vitro*, en órganos aislados (por efedrina o por β -(p-oxifenil)-isopropilmetilamina en útero de coneja o en intestino de conejo), y después, por simple lavado, han conseguido que desaparezca dicha taquifilaxia; es decir, que los órganos recuperen su sensibilidad normal al hacer una nueva adición de la sustancia simpaticomimética. Según ello, los receptores no se han alterado por efecto de las sustancias. Los experimentos citados demuestran también que la taquifilaxia depende incondicionalmente de la presencia de la sustancia taquifilactizante.

Para terminar, hemos de llamar la atención sobre una particularidad característica de la taquifilaxia: como ya se ha dicho, es típico de la taquifilaxia que la inyección de una sustancia transcurra sin efecto apreciable, *si bien* la acción manifiesta de la inyección anterior ha remitido, al parecer, por completo. Se crea, pues, una situación tal que en ella no existe ninguna acción manifiesta, a pesar de que puede demostrarse (véase antes) que la sustancia administrada está combinada, en forma intransformada, en receptores, a su vez también inalterados. Creemos que esta situación sólo puede significar que el

organismo ha efectuado una cierta *contrarregulación* apropiada. Esta opinión, considerada biológicamente, parece comprensible sin necesidad de admitir sino que la acción manifiesta de la sustancia administrada significa para el equilibrio del organismo una perturbación que ha de ser compensada. Se debe, además, admitir que la regulación compensadora del organismo solamente actúa mientras que la sustancia administrada ocupa los receptores. Al liberarse los receptores y desaparecer la regulación compensadora, el organismo vuelve a adquirir la capacidad de manifestar la acción de la sustancia. Creemos que esta concepción es de importancia fundamental para comprender la habitación propiamente dicha.

HABITUACION

Aparición de la habitación.

El tiempo que ha de transcurrir para que una sustancia administrada repetidamente origine habitación propiamente dicha, no es, en oposición a la taquiflaxia, de minutos ni horas, sino de días y semanas, y, en ocasiones, de meses. No pueden darse datos más precisos que a la vez posean validez general, porque la creación de habitación depende de distintos factores, entre otros, la sustancia, la especie animal, la acción por la que se aprecie la habitación. Es cierto que es posible dar los datos detallados de los casos particulares, lo que se ha hecho ya en parte; por ejemplo, por MYERS (1918, 1925), para la habitación del conejo a la acción diurética de la cafeína, y por GRUBER y KEYSER (1946), para la habitación del perro a la acción hipnótica del ácido butiletilbarbitúrico. En principio, ambos autores han procedido del mismo modo, observando el desarrollo de la habitación desde la primera inyección hasta su momento máximo. Este estado de habitación máxima se consiguió con la cafeína al cabo de unos cuatro meses, mientras que con el derivado barbitúrico sólo se necesitaron unos cuatro días. Lo que, bien establecido, se observa en estos dos ejemplos concuerda totalmente con la impresión general que se adquiere al examinar la literatura concerniente a la velocidad de desarrollo de la habitación. Parece que, hablando en general, la habitación a los barbituratos y a la nicotina requiere un tiempo relativamente breve, mientras que la habitación al alcohol, a la cafeína y a la morfina sólo se produce el cabo de un tiempo más prolongado.

Acerca de la posible importancia que pueda tener la periodicidad de la administración para conseguir la habitación, no podemos exponer una opinión fundada debido a lo escaso del material de observación. En todo caso, no parece ser demasiado grande.

Mucho más importante es el problema relativo al *tamaño de las dosis* que deben administrarse para que la habitación resulte la mayor posible y se forme con la máxima rapidez. La impresión general en que en este caso, como en el de la taquifilaxia, la habitación se desarrolla, en general, tanto más rápidamente cuanto mayores sean las dosis individuales administradas. Por ejemplo, TATUM, SEEVERS y COLLINS (1929) han observado que los perros se habitúan a las acciones depresivas del sistema nervioso central de la morfina más aprisa cuando se administran grandes dosis progresivas que cuando se sigue administrando siempre la dosis inicial. Análogas observaciones comunican SCHMIDT y LIVINGSTON (1933). EDMUNDS (1909) no consiguió habituar a un perro por la administración de pequeñas dosis de nicotina, lo que logró, en cambio, cuando elevó la dosis. SEMURA (1934) añade que los fibroblastos de gallina en cultivo de células se habitúan tanto más rápidamente a la acción inhibitoria del crecimiento ejercida por la morfina, cuanto más altas sean las concentraciones de morfina con que se tratan.

Al hablar precisamente del tamaño de las dosis que hay que administrar, queremos señalar también otro punto que nos parece interesante, tanto teórica como prácticamente: para que se produzca habitación no basta que la sustancia esté presente en el organismo, sino que debe reaccionar con él; es decir, debe anclarse a receptores y desplegar una acción. Algunas investigaciones efectuadas recientemente por uno de nosotros [BUCHER (1949)] demuestran especialmente esta afirmación.

BUCHER, en sus experimentos estudia el espasmo bronquial que sufre el cobayo si se le expone a un aerosol de histamina [método de KALLOS y PAGEL (1937)]. Determinó en todos los animales el tiempo que transcurre hasta la aparición de una disnea manifiesta de intensidad, definida, en primer lugar, al comenzar la prueba y, en segundo lugar, al terminarla diez días después. Los animales se distribuyeron en tres grupos del mismo número, que se trataron como sigue: los del primero, se sometieron una vez al día, a lo largo de todo el período (días 1-10), a un aerosol de histamina hasta aparición de fuerte disnea dicha. Los del grupo segundo se expusieron, también una vez al día, al aerosol de histamina, pero, simultáneamente, a un antagonista de la histamina [piribenzamina; MAYER y colaborado-

res (1945)] en una concentración tal que impida la aparición de todo fenómeno de espasmo bronquial. Los animales de este grupo no sufren ningún efecto apreciable desde fuera, exteriormente; la duración de la exposición al aerosol fué la misma que en los animales del primer grupo. Finalmente, los cobayos del tercer grupo sirven como testigos y no se someten a tratamiento durante el periodo dicho. Se observó que la sensibilidad para la histamina de los animales del tercer grupo (animales testigos) no se modificó durante los diez días ni tampoco la de los animales del segundo grupo, mientras que los del primero desarrollaron manifiesta habitación, bien comprobada estadísticamente, a la histamina. Conforme a nuestros conocimientos actuales, parece que la única diferencia que pueda existir entre el primero y el segundo grupo es que en éste, por la presencia de piri-benzamina, la histamina no ha podido alcanzar en los bronquios los receptores de sus órganos desencadenantes, ni por ello ejercer su acción. Por lo demás, en ambos casos el organismo ha recibido la misma cantidad de histamina. La importancia teórica de tales investigaciones, en nuestra opinión, consiste, en primer lugar, en que trasladan todo el problema de la habitación desde el punto de vista antiguo, puramente químico, a una consideración de tipo biológicamente funcional; en otras palabras: en estas investigaciones se concede un importante papel en la creación de habitación a la acción efectiva de la sustancia. La consecuencia práctica inmediata de las investigaciones es que sería de una osadía sin perspectivas el intento de forzar una habitación enérgica o rápida a la histamina, utilizando dosis elevadas de histamina, relativamente exentas de peligro en presencia simultánea de un antihistamínico.

Como hemos expuesto anteriormente, según la experiencia general, la habitación se crea tanto más rápidamente cuanto mayores son las dosis aisladas recibidas; ahora bien, al intentar por este medio la aceleración del desarrollo de la habitación se tropieza con un límite natural. En efecto, las dosis administradas no pueden ser tan altas (o, por lo menos, no serlo al repetir las seguidamente) que produzcan una acción demasiado fuerte. Para desarrollar una habitación es necesario no provocar acciones secundarias, especialmente tóxicas, como consecuencia de una dosificación excesiva. En ocasiones sucede que por este motivo retroceda una habitación ya creada, e incluso que sea reemplazada por una *exaltación* de la sensibilidad. Estos casos se han descrito en distintas ocasiones. Por ejemplo, por SCHMIDT y LIVINGSTON (1933), para la morfina, y después, y con gran frecuencia, para los barbituratos [SEEVERS y TATUM (1931), CARMICHAEL

y POSEY (1933), GRUBER y KEYSER (1946)]. Este estado ha sido considerado por SELYE (1937) en sus experimentos como un estadio particular, al que denomina de "agotamiento" (*Erschöpfung*). En él, es malo el estado general de los animales. Estos hechos del posible retroceso de la habitación por dosis tóxicas nos parece, teóricamente, notable por dos razones. En primer lugar, porque habla en contra de la opinión, defendida por algunos autores [AMSLER (1931), STARKENSTEIN (1932)], de que la habitación consista en un envenenamiento crónico; y en segundo lugar, porque parece señalar que el estado de habitación se basa en una *función* activa del organismo.

Duración de la habitación.

Una habitación, en general, persiste mientras continúe administrándose al organismo la sustancia correspondiente. El único problema es, pues, el de cuáles han de ser los intervalos entre las administraciones sucesivas para que la habitación no remita. La respuesta a esta pregunta podría contestar simultáneamente a cuánto perdura una habitación creada cuando deja de administrarse la sustancia correspondiente. No debe sorprendernos que los datos de la literatura varíen de un caso a otro. Se admite que la habitación del hombre a la morfina remite al cabo de unos diez días después de suspender la administración del fármaco [LIGHT (1931)]. Los datos obtenidos de habitaciones de animales a la morfina varían entre dos y treinta días, según la especie animal y la acción utilizada como testigo. Por ejemplo, según JOEL y ETTINGER (1926), la habitación de las ratas a la acción narcótica remite a los treinta días, y, según CLOETTA (1903), ya a los dos días; MATSCHULAM (1937) encuentra para el efecto analgésico en el cobayo un período de remisión de doce días, como mínimo; BOSMAN (1930), unos siete días, para el efecto antidiurético, en perros, y EDDY y REID (1934), para la habitación también de perros al efecto narcótico, unas cuarenta y ocho horas, aunque la remisión no es completa. La habitación a cafeína (juzgado por el efecto diurético en hombre) desaparece por completo, según EDDY y DOWNS (1928), al cabo de unos dos meses. El período de remisión de la habitación al alcohol alcanza, según AHLQUIST y DILLE (1940), unos seis-doce días para el conejo, y según NEWMANN y CARD (1937), para el perro, en cambio, hasta siete meses. La habitación del hombre a los barbituratos, según los datos de MEHNER (1926), parece que desaparece a los pocos días de no administrarlos; en las ratas, según investigaciones de MOIR (1937), persiste, todo lo más, dos semanas.

Como consecuencia más importante de tales investigaciones podemos afirmar que la pérdida de una habitación—en oposición a la taquifilaxia—requiere no horas, sino, por lo menos, algunos días.

Cuando el intervalo entre las administraciones no es excesivo, como sucede en determinados casos, puede mantenerse la habitación todo el tiempo que se desee. Es cierto que pueden apreciarse ciertas variaciones de intensidad, porque ésta se deja influir por distintos factores. Por ejemplo, al aumentar la edad puede reducirse el grado de una habitación, como han observado DILLER (1929), en la habitación del hombre a la nicotina, y BEHREND y THIENES (1933), en la de las ratas a la nicotina. Además, la habitación puede desaparecer, como se expuso en el apartado anterior, cuando las dosis administradas son tan grandes que provoquen efectos generales tóxicos graves.

Si se está convencido de que, por una parte, para que remita una habitación se requiere un mínimo de varios días, y, por otra parte, que sustancias como la nicotina, cafeína, alcohol, cocaína, deben eliminarse del organismo casi totalmente a las veinticuatro horas, ya, *a priori*, parece poco probable que la habitación pueda deberse a un bloqueo de receptores. En todo caso podría discutirse brevemente esta posibilidad, pues cabría suponer que una sustancia que el organismo recibe diariamente pudiera acumularse en él paulatinamente hasta un grado tal que su eliminación necesitara un tiempo esencialmente mayor. Pero, de todas maneras, el bloqueo de los receptores *no* puede tenerse en cuenta para explicar una habitación, como se deduce de diversas observaciones y razonamientos. Por ejemplo, SIMON y EDDY (1935) han conseguido provocar en las ratas cierta habitación a las acciones depresivas del sistema nervioso central ejercidas por la morfina, aunque los animales recibían la morfina una vez por semana. Aunque la morfina se elimine sólo lentamente hay que admitir que, en las pruebas de SIMON y EDDY, las ratas, al recibir una nueva inyección, deben estar exentas, por decirlo así, de morfina. Además, PLANT y PIERCE (1933) han efectuado determinaciones exactas del contenido de morfina en perros habituados a ella, según los cuales, cuatro horas después de la última dosis la morfina que contiene todo el organismo alcanza al 20 por 100 de la dosis última. Si contrastamos con esto que, como se ha dicho antes, la habitación del perro a la morfina persiste aún siete días después de haber recibido la última dosis, resulta evidente que el bloqueo de receptores es inadecuado para explicar la habitación. Otra observación de los mismos autores resulta aún más convincente: recuperaron aproximadamente

la misma proporción de morfina en perros habituados y en los no habituados al alcaloide. Esto indica que, a pesar de que durante todo el período de la habituación los animales recibieron repetidas dosis de morfina, al parecer no se había producido una acumulación apreciable de la sustancia en el organismo.

En la literatura se encuentran aún otros datos apropiados para demostrar que la habituación no puede explicarse por un bloqueo de receptores. Nos referimos a observaciones como las obtenidas por LÉVY y CAHEN (1933) en cobayos habituados a la morfina, y por FARMER (1939) en cobayos habituados a la histamina. Estos autores aislaron trocitos de intestino o de útero de animales habituados y examinaron su comportamiento *in vitro*. Observaron que su sensibilidad frente a la morfina (histamina) era menor que la de los trozos de intestino normal. Subsiste, pues, cierto grado de habituación, a pesar de que el agua del baño necesariamente debería haber lavado la morfina (histamina) que pudiera restar en los órganos, y, por tanto, los receptores deben estar libres. Estas investigaciones demuestran simultáneamente, por exclusión, que la habituación es una propiedad adquirida del mismo organismo. Pero las observaciones de LÉVY y CAHEN, así como las de FARMER, contienen también otro punto importante que merece nuestra consideración: a pesar de que la habituación se ha creado por el tratamiento correspondiente de todo el organismo, su demostración no necesita el organismo completo. Los órganos aislados, e incluso las células particulares de un organismo, pueden ser soporte de las propiedades de habituación. En muchas ocasiones se ha logrado que células aisladas de animales de sangre caliente, en cultivos de tejidos, se habitúen a ciertas sustancias [SEMURA (1934), SAITO (1937), SASAKI (1938) y otros].

SUSTANCIAS QUE PRODUCEN HABITUACION

A continuación se tratará por extenso de algunas habituaciones de importancia práctica. Entre ellas se incluye la habituación a la morfina y a la cocaína, usadas como estupefacientes; a las sustancias paralizantes del sistema nervioso central, como el alcohol y los derivados barbitúricos; a la cafeína y nicotina, y, por último, a la histamina y a algunas otras sustancias.

LA HABITUACIÓN A LA MORFINA.

La habitación a la morfina, como se señaló en la Introducción, constituye el ejemplo por excelencia de habitación. Por consiguiente, es también la habitación más estudiada experimentalmente. Sin embargo, en este capítulo sólo nos ocuparemos, en primer lugar, de lo que ofrezca interés práctico inmediato, y, en segundo lugar, de lo que ofrezca interés especial para el análisis del mecanismo de la acción, ya que el objetivo principal de nuestras consideraciones, en su conjunto, es conseguir una visión de los mecanismos que constituyen el fundamento de la habitación. Por lo demás, el caso particular de la habitación a la morfina, y también a los derivados de la morfina y a otros alcaloides del opio, se trata, por extenso, en la monografía de KRUEGER, EDDY y SUMWALT (1941).

El hombre que recibe por primera vez una inyección de morfina, habitualmente no percibe las sensaciones peculiares eufóricas que dan ocasión al vicio. Para experimentarla, en general—aunque contando con grandes diferencias de unos individuos a otros—, se necesita recibir repetidas administraciones del alcaloide en el transcurso de semanas a meses. Por consiguiente, la euforia misma por morfina parece ya una manifestación de un cierto fenómeno de habitación. Pudiera pensarse que lo que se crea es habitación a ciertas acciones de la morfina cuyos efectos normalmente impiden o inhiben las manifestaciones eufóricas. Tal interpretación supone el postulado previo de que las habitaciones a las distintas acciones de la morfina han de ser muy distintas: en todo caso las acciones inhibitorias crean habitación mucho más fácilmente que las que dan lugar a la euforia. Ahora bien, los organismos, en efecto, se habitúan más a ciertas acciones de la morfina (véase el capítulo especial, págs. 50 y siguientes). Las acciones a este respecto se ordenan en esta serie:

1. Acción paralizante del sistema nervioso central (incluyendo, probablemente, la acción analgésica);
2. Acción retardadora de la respiración y calmante de la tos;
3. Acción sedante sobre el tubo digestivo;
4. Acción retardadora del pulso, emética, acción eufórica.

Con respecto a esta escala deseamos observar que sólo comprende las seis acciones citadas, es decir, que falta intercalar, donde corresponda, otras acciones de la morfina; igualmente debe señalarse que son de distinta magnitud las diferencias entre los cuatro grupos con-

siderados. De acuerdo con la concepción de que, por una parte, el morfinómano regula su dosis de morfina según el efecto euforiógeno, y, por otra parte, que las distintas acciones de la morfina difieren por la intensidad de la habituación que crean, se ha observado que el morfinómano, a pesar de recibir en ocasiones dosis muy grandes de morfina, no acusa ninguna perturbación de sus funciones respiratoria o digestiva. Esto queda muy de manifiesto en las extensas investigaciones de LIGHT (1931). LIGHT efectuó distintas investigaciones clínicas (unas 30)—ante todo examen de funciones—en un centenar de morfinómanos que disponían libremente de morfina y que vivían por lo demás en condiciones regulares, y apenas pudo observar ninguna desviación de lo normal. Se debe, pues, modificar la antigua concepción de que el morfinismo conduce a la ruina corporal, en el sentido de que esta ruina no se produce directamente por una acción somática de la morfina, sino indirectamente a consecuencia de las condiciones externas, en general no satisfactorias, en que suele vivir el morfinómano como consecuencia de la alteración de su personalidad. Pero el mismo LIGHT ha señalado también que el morfinómano puede soportar mucha más morfina que la necesaria para satisfacer su apetencia. Si, por ejemplo, se "satisface" con una inyección subcutánea de 0,25 g., puede recibir 2 g. por vía *intravenosa* en el transcurso de dos horas y media sin ninguna perturbación aparente.

Con respecto a cuál sea el grado a que pueda llegar la habituación a la morfina, hay que decir que, en general, la morfina (junto con algunos de sus derivados) es la sustancia de las conocidas hasta la fecha con la que pueden conseguirse las habituaciones más fuertes por gran diferencia. Los morfinómanos muy habituados llegan a consumir 5 y más gramos diarios y, según las investigaciones mencionadas de LIGHT, pueden soportar dosis mucho mayores. Esta resistencia contrasta con que 0,2 g. de morfina administrada subcutáneamente puede bastar para producir una muerte aguda a un hombre normal (es cierto que entre éstos existen grandes diferencias individuales); es decir, resulta una habituación a dosis 50 a 100 veces dicha dosis letal. Tales habituaciones máximas, en general, sólo se producen paulatinamente en el transcurso de un consumo continuado de morfina a lo largo de meses. Al cesar la administración regular, la habituación se pierde muy rápidamente, en pocos días, casi por completo. Al renovar la administración se recupera la habituación con velocidad mayor que en el primer período.

Mecanismo de la acción.

Como experimentando con animales también se consigue fácilmente habituarlos a la morfina, se han podido efectuar extensas investigaciones para esclarecer el mecanismo de la acción. Hasta la fecha se han defendido, principalmente, los siguientes puntos de vista:

La teoría de GIOFFREDI.

GIOFFREDI (1899) creyó observar que el suero de perros habituados a la morfina posee propiedades antitóxicas. Por la inyección de tal suero a animales de otra especie se aumenta ligeramente su tolerancia para la morfina. La mayor parte de los investigadores posteriores no han podido confirmar los resultados de GIOFFREDI.

La teoría de FAUST.

FAUST (1900) consideró que la causa de la habituación a la morfina es una aceleración de la destrucción de la morfina en los tejidos. Basó su opinión en experimentos según los cuales después de administrar una dosis determinada de morfina a perros normales se encuentra, aproximadamente el 60 por 100 en las secreciones (principalmente en las heces), mientras que si se administra a perros habituados no se descubre prácticamente nada. La teoría de FAUST era seductoramente sencilla; pero — al igual que la teoría de GIOFFREDI — no alcanza a explicar, ante todo, por qué en un mismo individuo la habituación para las diversas acciones de la morfina puede ser muy distinta. La teoría sólo podría explicarlo si de dos o más acciones de la morfina en cuestión, las que son más sensibles, es decir, las que pueden conseguirse con pequeñas concentraciones, fueran también aquellas para las que la habituación es menos intensa. Pero la experiencia general no descubre tal correlación. La teoría de FAUST, posteriormente, ha sido apoyada en parte y en parte impugnada por distintas investigaciones, como, por ejemplo, las del contenido de morfina en el animal entero, la capacidad de destruir la morfina que poseen tejidos aislados y experimentos análogos, hasta que GROSS y THOMPSON (1940) consiguieron un avance considerable en esta investigación. GROSS y THOMPSON observaron en experimentos exactos efectuados en perros que la morfina no se elimina exclusivamente como tal (como morfina denominada "libre"), sino, en su mayor parte, en forma combinada

(¿como glucuronato?), hecho a que no se había prestado suficiente atención en los métodos para valorarla usados en investigaciones anteriores. De los protocolos de GROSS y THOMPSON se deduce que de una determinada dosis de morfina administrada a un perro normal, se elimina en el transcurso de veinticuatro horas un 60-70 por 100 (ante todo por las heces y la orina), mientras que en los perros habituados se elimina una cantidad manifiestamente menor. Por tanto, los autores, de acuerdo con FAUST, llegan a la conclusión de que los animales habituados posiblemente destruyan la morfina más rápidamente que los normales. Ahora bien, las diferencias observadas no bastan de ningún modo para explicar por este mecanismo el elevado grado de la habituación a la morfina. (Aunque puede admitirse que la destrucción acelerada puede cooperar a la habituación de ciertos animales a algunas acciones de la morfina.)

Fundándose en los descubrimientos positivos de GROSS y THOMPSON, podría pretenderse que la teoría de FAUST por sí sola ofrece explicación suficiente para la habituación a la morfina. Ahora bien, habría que hacer la hipótesis adicional de que en los lugares donde ejerce su acción la morfina, la capacidad de destrucción del alcaloide está más exaltada que en la totalidad del organismo, ya que en los balances del contenido de morfina en todo el organismo participa la gran cantidad de ella, se encuentra en lugares indiferentes. Deseamos oponer frente a tal concepción que, aun cuando, en cualquier lugar del organismo la morfina se destruyera mucho más rápidamente que en el resto, a consecuencia del desnivel de concentración producido, se dirigiría hacia este lugar la morfina existente en el resto del organismo. Hemos considerado sucintamente lo anterior para señalar que, dado lo poco profundos que son nuestros conocimientos actuales, una consideración general minuciosa no permite avanzar apreciablemente en la inteligencia de los problemas de la habituación. No es ésta la última razón de las que nos han aconsejado no considerar el material existente desde puntos de vista generales.

La teoría de CLOETTA.

CLOETTA (1903), por exclusión, pensó que la habituación a la morfina ha de ser debida a una "habituación paulatina del protoplasma" al alcaloide; no pudo ofrecer ninuna hipótesis concreta del mecanismo. Esta teoría fué recogida posteriormente por muchos autores que intentaron precisarla más o menos. Entre los intentos de precisión queremos mencionar únicamente que, entre otros autores, ya GUNN (1923) consideró que, ante todo, el fenómeno de la "habituación inespecífica" señala que las células están habituadas a un *tipo de acción* especial.

La teoría de TATUM y colaboradores.

TATUM, SEEVERS y COLLINS (1927, 1929) han intentado explicar la habituación a la morfina del modo siguiente: parten de la conocida experiencia de que la morfina, en general, ejerce acciones tanto paralizantes como estimulantes del sistema nervioso central, y que las paralizantes se producen antes, pero duran menos que las estimulantes. Cuando se administra—arguyen los autores citados—una segunda dosis de morfina en un momento en que ya han remitido las acciones paralizantes de la primera dosis, pero aun persisten en parte las estimulantes, los efectos paralizantes de esta segunda dosis han de ser menos acusados. Estarán parcialmente compensados por las estimulaciones latentes o manifiestas que aun perduren. Cuando las sucesivas inyecciones de morfina se administren a intervalos convenientes, la excitación persistente se acumulará más y más, es decir, se intensificará y, de acuerdo con ello, se irán debilitando paulatinamente los efectos paralizantes de cada dosis. Pero en esto consiste el estado de habituación para estas últimas acciones. La teoría, como subrayan TATUM y colaboradores, de primera intención sólo explica el caso particular de la habituación a las acciones depresivas del sistema nervioso central de la morfina. Pero nos parece especialmente interesante para nuestras consideraciones, por atribuir la causa genuina de la habituación a ciertas “acciones compensadoras del organismo”, aunque, ciertamente, estas reacciones no están concebidas como regulaciones compensadoras del organismo, sino como acciones directas de la morfina.

En conexión con la teoría de TATUM y colaboradores, hemos aún de mencionar que ya, en 1883, MARMÉ había concebido la habituación a la morfina como resultante de dos acciones farmacológicas opuestas. La diferencia principal entre los puntos de vista de MARMÉ y de TATUM y colaboradores sólo consiste en que, según MARMÉ, no es la morfina misma la que de modo primario ejerce la “acción contrapuesta”, sino que hace responsable de ésta a un producto de transformación de la morfina producido en el organismo de modo secundario: la oxidimorfina. MARMÉ sólo descubrió oxidimorfina en el consumo crónico de morfina. La teoría es muy interesante, y pudiera explicar muchas más facetas de la habituación a la morfina que la de TATUM y colaboradores. Pero MARMÉ demostró muy insuficientemente la supuesta acción antagónica de la morfina, que atribuyó a la oxidimorfina; además, el producto mismo nunca pudo ser encontrado por investigadores posteriores.

La teoría de AMSLER.

AMSLER (1931) parte de la suposición de que la morfina sea un "veneno de fases" y que, por ello, pueda actuar sobre el sistema nervioso central tanto paralizándolo como estimulándolo. Es decir, actúa sobre el mismo substrato de la acción (y en esto se opone a la teoría de TATUM y colaboradores) primero inhibiéndolo y después estimulándolo. Se trata de la denominada acción "dinámica" de la morfina. (Señalemos de pasada que no acabamos de comprender por qué AMSLER subraya tanto la identidad del substrato de la acción; en primer lugar, no existe ningún punto de apoyo para afirmarla, y, en segundo, no es necesaria para el principio de la teoría de AMSLER.) El momento del tránsito de la fase paralizante a la estimulante (y con ello la duración de la primera fase) debe ser dirigida de un cierto modo por la morfina misma. AMSLER designa esta acción directora como acción "estática" de la morfina. Esta acción, en opinión de AMSLER, posiblemente se produzca debido a que la morfina debe ser una sustancia potencial en el sentido de STRAUB. Además, el contenido de morfina en la célula es lo que dirige la acción dinámica en fases, tal vez como si cuanto mayor sea el contenido de morfina en la célula tanto más pase a primer plano la fase estimulante. De ello deduce AMSLER la consecuencia de que la habituación a la morfina no debe consistir de ningún modo en una adaptación del organismo, sino que más bien debe ser la manifestación de un envenenamiento por morfina (del elevado contenido del alcaloide en las células correspondientes). En opinión de AMSLER, todos los fenómenos de habituación, en especial la habituación al alcohol, tal vez encuentren explicación en un mecanismo semejante en lo fundamental al expuesto por él para explicar el caso especial de la habituación a la acción paralizante del sistema nervioso central ejercida por la morfina.

En un trabajo posterior aduce AMSLER diversos puntos que deben defender su teoría [WEGER y AMSLER (1936)]. Entre otros rechaza como inútil la existencia de una hiposensibilidad como factor de la habituación. Pero simultáneamente subraya que la dirección "estática" ejercida por la morfina tal vez pueda aún continuar actuando cuando ya no exista morfina en el organismo. Pero de este modo, en nuestro sentir, postula precisamente la existencia de una alteración celular fuera de la presencia de la morfina, y con ello, por lo menos, la existencia de una "sensibilidad celular alterada". Con respecto a la teoría de AMSLER debe señalarse además, como objeción importante,

que actualmente se ha puesto en duda por varias razones la realidad de una de sus premisas fundamentales: la actividad de sustancias potenciales. En todo caso, de la serie, nutridísima en tiempos, de las presuntas "sustancias potenciales" van quedando tan pocas, que apenas puede considerarse posible tal mecanismo de acción.

LA HABITUACIÓN A LA COCAÍNA.

El gran consumo de la cocaína como estupefaciente se funda, ante todo, en su acción particular, provocando alucinaciones que, hasta cierto grado, pueden dirigirse en la dirección deseada [puede profundizarse en este asunto en obras especializadas como las de JOEL y FRÄNKEL (1924), MAIER (1926)]. El cuadro de síntomas somáticos consiste en estado de embriaguez (comienzo del envenenamiento por cocaína); en primer lugar, excitación motora, después ataxia, pérdida general de sensibilidad para el dolor, estímulo adrenérgico (como dilatación de las pupilas y taquicardia), sequedad de la boca, piel pálida y en general algo húmeda, ganas de defecar, etc. Los cocainómanos suelen tomar el alcaloide sorbiéndolo en polvo, lo que, como es sabido, provoca con relativa rapidez una rinitis ulcerosa con subsiguiente perforación del tabique nasal. En los comienzos del vicio suelen tomarse, según JOEL y FRÄNKEL, porciones de 0,05 g., y los cocainómanos habituados, cantidades cinco o diez veces mayores, que se repiten varias hasta hacer un total de 5 a 10 g. por día. Es dudoso en qué medida estas elevaciones de la dosis se deban a una estricta habituación en el sentido de nuestra definición.

Como es sabido, el abuso de cocaína conduce mucho más rápidamente que el de morfina a una grave ruina orgánica. La causa de esta decadencia debe atribuirse, por una parte, a la excitación permanente y, por otra, a la acción anestésica general; aquella acción conduce a un aumento del metabolismo basal, y ésta a la pérdida del apetito y a la reducción de la producción del jugo gástrico. El hecho mismo de la rápida destrucción orgánica señala ya que el organismo no debe habituarse fácilmente a las acciones de la cocaína responsables de tales efectos nocivos. Esta opinión encuentra confirmación experimental, entre otras investigaciones, en las de MORERA (1928), que observó en un masticador de cocaína crónico un metabolismo basal un 30 por 100 más alto que el de personas normales usadas como testigo. Por consiguiente, no es seguro que exista una habituación completa. JOEL y FRÄNKEL (fundándose principalmente en el predominio de

resultados negativos en la experimentación en animales) niegan que sea posible, en general, la habituación a la cocaína; explican del modo siguiente el hecho de que los cocainómanos con el tiempo aumenten las dosis: "En los casos observados por nosotros la única causa conducente al aumento paulatino del consumo del veneno fué el deseo de reproducir *más frecuentemente* una acción que no resultaba—por lo demás—menos intensa que al principio, junto con la experiencia de que ello podía hacerse sin riesgo especial."

Creemos, sin embargo—en contra de JOEL y FRÄNKEL—, que los cocainómanos aumentan la dosis de cocaína principalmente porque ya no consiguen con la anterior la acción deseada, es decir, porque se han habituado a la cocaína. En efecto, la mayor parte de los cocainómanos admiten en su anamnesis que al principio, es decir, después de las primeras tomas, sufrían como secuela una inquietud que duraba un día y una noche, inquietud que, con el tiempo, a pesar de la dosificación creciente, han ido perdiendo más y más. Esto sólo puede ser una manifestación de cierta habituación a la acción estimulante. A unas conclusiones análogas se llega al comparar las dosis mortales para la cocaína con las dosis que toman regularmente los cocainómanos muy envenenados. La dosis mortal por vía oral alcanza, según ROST (1929), a 1,5 g., aproximadamente; en cambio, se conocen muchos casos [véase POULSSON (1920), JOEL y FRÄNKEL, MAIER] de cocainómanos que en el transcurso de pocas horas toman 5-10 g. por vía nasal, y téngase en cuenta que por esta vía la cocaína se incorpora aún más rápidamente, y sobre todo más completamente que por vía oral. Con más seguridad aún pueden enjuiciarse los casos en que la cocaína se inyecta subcutáneamente. La dosis mortal por esta vía asciende, según POULSSON, a 0,2-0,8 g. y, según KOHN-ABREST (1948), a unos 0,2 g.; pues bien, los cocainómanos graves pueden inyectarse diariamente de 3 a 5 g. [HAUPT (1886), HIGIER (1911) y otros]. Con respecto a los masticadores de coca (costumbre muy extendida en ciertas comarcas de Sudamérica), un masticador medio consume unos 50 g. diarios de hojas de coca preparadas, que suponen unos 0,25 g. del alcaloide. Sin embargo, apenas se aprecia decadencia física después de un consumo de años. En oposición al cocainómano, los que mastican coca elevan su capacidad de trabajo corporal y simultáneamente disminuyen la sensación de hambre [MERZBACHER (1929)]. Para el masticador de coca normal la finalidad de su hábito no es embriagarse, sino el aumento de su capacidad de trabajo. En general aumentan el consumo de coca de acuerdo con el trabajo que han de efectuar. No parece que se produzca habituación propiamente dicha

o, en todo caso, no es fuerte. Cuando se comparan los datos registrados en los masticadores de coca con los del cocainismo, se impone la idea de que los componentes psíquicos de la acción de la embriaguez cocáinica son principalmente los que crean habitación. La cocaína, pues, difiere de los alcaloides del tipo de la morfina en que éstos crean habitación para diversas acciones suyas; también puede decirse con seguridad que la habitación a la cocaína es cuantitativamente menos intensa que la habitación a la morfina.

Sólo rara vez se ha conseguido habituar animales a la cocaína. Según ABE y TAKEBAYASHI (1930), los perros pueden habituarse por la administración diaria de pequeñas dosis de cocaína, de modo que llegan a resistir dosis que normalmente los matan. Pero otros investigadores al efectuar el mismo ensayo obtuvieron siempre resultados negativos [véase literatura en POULSSON (1920), LAUBENDER (1939)]. De los protocolos de ANREP (1880) podía ya deducirse que los conejos que reciben durante treinta días diariamente unas 0,01-0,02 g/kg. de cocaína por vía subcutánea no adquieren ninguna habitación. Por el contrario, parece observarse más bien un cierto aumento de la sensibilidad, ya que los animales, que desde un principio se excitan fácilmente, después lo hacen con intensidad creciente. Muchos otros autores informan también del aumento de sensibilidad para la cocaína a consecuencia de la administración crónica del alcaloide. Por ejemplo, GRODE (1912), de la acción estimulante en cobayos, conejos, gatos y perros; DOWNS y EDDY (1932), de la acción estimulante en perros y ratas; OELKERS y RINTELEN (1933), de las acciones estimulantes en ratones, cobayos y perros.

Mecanismo de acción.

Dado que, en líneas generales, no puede lograrse la habitación de animales a la cocaína, y que, por otra parte, algunos autores incluso niegan que en el hombre se cree habitación a la cocaína, se entiende fácilmente que casi no se sepa nada del mecanismo de la habitación a la cocaína. Los únicos que han expuesto una opinión concreta respecto a este punto son ABE y TAKEBAYASHI (1930). Creen haber observado que los animales habituados contienen más cantidad de cocaína en la sangre y menos "combinada" en el sistema nervioso central que los animales normales. La capacidad de combinación de otros órganos, como el hígado y los músculos, era aproximadamente igual en los animales habituados y en los no habituados. Por ello ABE cree que, de modo análogo a lo que él supone que sucede con la mor-

fina, la habituación a la cocaína pudiera deberse a una modificación de los coeficientes de partición, "concentración en órgano/concentración en sangre".

LA HABITUACIÓN AL ALCOHOL.

La experiencia de la vida diaria nos enseña que, al parecer, el hombre puede habituarse al alcohol, pues es bien sabido que el bebedor habitual "resiste" mucha más cantidad de alcohol que el principiante. Se han aducido pruebas objetivas, como comparar en habituados y no habituados las relaciones de las concentraciones de alcohol en sangre con los grados de embriaguez (véase el apartado que seguirá luego acerca del mecanismo de acción). En experimentos con animales puede también conseguirse con relativa facilidad una habituación al alcohol, y puede decirse que se habitúan los animales de todas las especies examinadas a este respecto hasta la fecha. La habituación se demostró de modo particularmente claro en los trabajos de LEVY (1935) en ratas, de NEWMAN y LEHMAN (1938) en perros y de AHLQUIST y DILLE (1940) en conejos. En el apartado concerniente al mecanismo de esta habituación se recogerán más datos bibliográficos concernientes a la habituación de distintos animales al alcohol. La revisión, en general, resulta especialmente fácil porque la habituación se considera por todos los autores tomando como criterio el efecto narcótico del alcohol.

Grado de habituación.

Al estudiar la literatura concerniente a la habituación al alcohol se recibe la impresión general de que la habituación, por así decirlo, se obtiene con seguridad en todos los casos; pero, en cambio, en primer lugar, que es relativamente lenta, es decir, que sólo se desarrolla previo largo tratamiento y, en segundo lugar, que es poco acusada. En los trabajos de LENDLE (1927), LEVY (1935), AHLQUIST y DILLE (1940) y GOLDBERG (1943) se exponen datos detallados y considerados de modo objetivo acerca de ambos puntos. LENDLE mantuvo ranas, en lugar de en agua corriente normal, en agua que contenía un 0,7-1,0 por 100 de alcohol etílico. A las siete semanas de vivir ininterrumpidamente en este medio, la concentración de alcohol necesaria para provocar una narcosis completa de las ranas era un 20-30 por 100 más elevada que la normal. LEVY utilizó gran número de ratas,

a las que durante tres meses administró diariamente por vía oral alcohol etílico en cantidad paulatinamente creciente. Como medida de la sensibilidad para el alcohol se determinó la cantidad que, inyectada por vía intravenosa en el transcurso de un minuto, narcotiza totalmente al animal, por lo menos durante tres a cuatro minutos. Mientras que esa dosis es, para los animales normales, de 2,16 g/kg., para los animales habituados alcanza, en cambio, a 2,72 g/kg.; es decir, el grado de habitación sube en este caso (como en las ranas de LENDLE) a un 30 por 100. AHLQUIST y DILLE trataron conejos diariamente con 1,5 g./kg. de alcohol etílico al 20 por 100 que administraban por vía peritoneal. Como medida de la sensibilidad para el alcohol eligieron el denominado "tiempo de sueño", es decir, el tiempo que transcurre desde que el animal se duerme a consecuencia de una dosis fija narcótica que se administra por vía intravenosa (1,5 g/kg. de alcohol al 20 por 100) hasta que se despierta de modo espontáneo. Observaron que los animales que habían sido habituados durante veinticinco días dormían la mitad del tiempo que los animales testigo; es decir, en estos animales el grado de habitación debe tasarse en el 100 por 100 aproximadamente. Finalmente, GOLBERG determinó en 10 abstemios, 16 bebedores moderados y 14 bebedores fuertes la concentración de alcohol en sangre necesaria para que se alteren de modo apreciable (medible) los umbrales observados para cada uno de ellos en estado normal, es decir, en ayunas, en determinadas pruebas típicas (como, por ejemplo, la distinción entre una bujía oscilante y una quieta y análogos). Encontró que, por término medio, los abstemios necesitaban un 0,33 por 1.000, los bebedores moderados un 0,61 por 1.000 y los bebedores fuertes un 0,86 por 1.000 de alcohol en sangre, lo que supone un grado de habitación del 100 por 100 en los bebedores moderados y de cerca del 150 por 100 en los bebedores fuertes. Estas bases objetivas parecen demostrar suficientemente la opinión expuesta al comenzar este apartado.

Mecanismo de la acción.

La teoría más antigua para interpretar la habitación al alcohol procede de PRINGSHEIM (1908), que observó que los hígados de ratas habituadas al alcohol, a los que se añadía alcohol atílico, lo destruían un 30 por 100 más aprisa que los hígados de animales normales testigo. Como, por otra parte, se ha demostrado que la eliminación del alcohol se efectúa fundamentalmente por el hígado (se elimina sólo un pequeño tanto por ciento por los pulmones, riñón y heces),

PRINGSHEIM y, posteriormente, también SCHWEISHEIMER (1913), pretenden que la habituación al alcohol se debe a una *oxidación acelerada*. A las mismas conclusiones llegaron también GETTLER y FREIREICH (1935) en sus investigaciones en perros. Pero aunque quepa aceptar que, en ciertos casos, pueda contribuir a la habituación una oxidación acelerada del alcohol, está demostrado que de ningún modo puede ser ésta la causa general de la habituación. En efecto, la mayor parte de los investigadores posteriores han obtenido a este respecto resultados decisivamente negativos; por ejemplo, según la teoría de PRINGSHEIM, cabría esperar que después de una inyección intravenosa de alcohol la concentración de alcohol en sangre descendiera a los valores normales más rápidamente en los individuos habituados que en los no habituados. Sin embargo, BROGGI (1935) en perros y hombres, NEWMAN y CUTTING (1935) y NEWMAN y LEHMAN (1938) en perros y FLEMING y STOTZ (1936) en hombres, no pudieron observar ninguna diferencia a este respecto. De un modo algo distinto, LEVY, en 1935, hubo también de diferir de la teoría de PRINGSHEIM. Mató ratas habituadas y no habituadas a distintos tiempos medidos a partir del momento en que habían recibido por vía intravenosa una determinada dosis de alcohol, y determinó el contenido de alcohol en los distintos órganos. La concentración de alcohol en la sangre, hígado, cerebro y riñones eran iguales en ambos grupos. Finalmente, distintos autores—como hizo PRINGSHEIM—añadieron alcohol *in vitro* a papilla de hígados de animales habituados y no habituados, sin que, al contrario que PRINGSHEIM, pudieran observar ninguna diferencia en la velocidad de demolición [BATTELLI y STERN (1910) en perros, HIRSCH (1916) en conejos y LOLOIR y MUÑOZ (1938) en ratas]. Teniendo en cuenta estas pruebas, la opinión actual se ha separado del punto de vista de PRINGSHEIM, punto de vista que, dicho sea entre paréntesis, constituye en nuestra opinión un supuesto importante para el examen de las funciones hepáticas mediante alcohol que recomiendan distintos clínicos [BROGGI (1935), ERWTEMAN y HEERES (1938), STAUB (1945) y otros].

Distintos autores han considerado la medida en que una mayor lentitud en la absorción pudiera contribuir a que los bebedores soporten más alcohol que los abstemios. Parece admisible tal posibilidad, desde que LENDLE (véase antes) observó que las ranas pueden habituarse a vivir en altas concentraciones de alcohol; pero simultáneamente que los animales así habituados son, más bien, más sensibles al alcohol inyectado que los animales testigo. Según ello, en estas pruebas la habituación parece deberse, de hecho, a una reducción de

la permeabilidad de la piel para el alcohol. Ahora bien, para los animales de sangre caliente nunca ha podido demostrarse nada análogo. Si se administra alcohol por vía oral y se juzga la velocidad de absorción por el curso de la concentración de alcohol en sangre, en la mayoría de los casos no se aprecia ninguna diferencia entre habituados y no habituados; procediendo así, MILES (1923), MATOSI (1932), BINSWANGER (1933), GRAF y FLAKE (1933), JUNGMICHEL (1933) y otros encontraron las mismas relaciones en abstemios y alcohólicos. En casos aislados se encontró incluso una aceleración de la absorción en los habituados, como observaron, por ejemplo, FAURE y LOEWE (1923), KEESER y OELKERS (1937), ASCHOFF (1938) en conejos, y BERNHARD y GOLBERG (1943) en hombres. La causa puede ser, en parte, que las gastritis que con frecuencia padecen los alcohólicos favorezcan en ocasiones la absorción por el estómago. En perros habituados al alcohol pudo también demostrarse directamente cierta aceleración de la absorción, para lo cual se mataron los animales a diferentes tiempos después de tomado el alcohol y se determinó el alcohol no absorbido que contenía aún el tubo digestivo [VÖLDZ y DIETRICH (1915), GETTLER y FREIREICH (1935)]. Fundándose en estas investigaciones, puede darse por seguro que la mayor tolerancia para el alcohol de los bebedores no puede deberse a una reducción de la absorción.

Dado que la habituación no se debe ni a que la absorción sea más lenta ni a que la eliminación sea más rápida, resta, como una tercera posibilidad más probable, la denominada "hiposensibilidad adquirida del sistema nervioso central". Esta teoría no solamente se impone por exclusión, sino que existen también pruebas directas de ella, por ejemplo, la observación de que para la misma concentración de alcohol en sangre los individuos habituados acusan claramente menos los efectos del alcohol que los no habituados. Según MATOSI (1932), JETTER (1938), HASSELBALCH y LARSEN (1940) y GOLBERG (1943), para la misma concentración de alcohol en sangre los abstemios presentan manifiestamente mayores síntomas de embriaguez que los bebedores habituados. Análogas diferencias observaron en perros NEWMAN y LEHMAN (1938) y LEHMAN, SCHWERMA y RICKARDS (1945) (los últimos con el alcohol isopropílico). Ahora bien, la concentración de alcohol en sangre, si no una medida absoluta, nos ofrece al menos una medida relativa de la concentración de alcohol en los órganos, incluyendo el cerebro, de modo que demuestra la existencia de "una sensibilidad reducida del sistema nervioso central" en los habituados. Ahora bien, hasta la fecha no puede emitirse una opinión

del grado en que esta reducción de la sensibilidad contribuya a la habituación, y posiblemente lo haga en proporción muy distinta en cada caso particular. Ni tampoco está claro en qué consista en último término. Tal vez se trate de una hiposensibilidad del mecanismo directamente responsable de la acción del alcohol. Pero quizá se trate de una reducción de la sensibilidad del sistema nervioso central en su totalidad; es decir, sencillamente, de que se hayan hecho más efectivas una o varias regulaciones compensadoras funcionales del organismo. Este último pensamiento hubo de presentársele a GOLBERG cuando dijo que los alcohólicos han aprendido a compensar mejor psíquicamente las acciones del alcohol.

En resumen, puede decirse, sin más, que es posible una habituación genuina al alcohol. Sin embargo, sólo se produce con relativa lentitud (en comparación, por ejemplo, con la habituación a la nicotina) y no alcanza un grado elevado. En lo fundamental, probablemente, se debe a una hiposensibilidad adquirida por el sistema nervioso central.

LA HABITUACIÓN A LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO BARBITÚRICO.

Con frecuencia se escucha quejarse a pacientes de que los somníferos (en general se trata de barbituratos), que en un principio habían actuado bien, han dejado de ejercer efecto suficiente. Tales expresiones llevan, naturalmente, a opinar que dichos enfermos se han habituado al remedio. Pero antes de considerar demostrada una habituación debe comenzarse por poner en claro en qué medida hayan podido cambiar ciertas circunstancias exteriores, factor éste que, precisamente en los somníferos, pudiera ser responsable de la debilitación experimentada de su acción. Y así, numerosos autores que se han ocupado del problema de la habituación a los barbituratos, no han podido observarla, sino rara vez o incluso nunca [CURRAN (1933), WILLCOX (1933), McLOWANS (1933)]. Pero, por otra parte, después de las investigaciones de MEHNER (1926) y de POHLISCH y PANSE (1934) apenas puede dudarse, sin embargo, de que sea posible una habituación del hombre a los barbituratos.

Si, en busca de una aclaración del problema, se recurre a la experimentación en animales, también se enfrentan los resultados positivos y los negativos, aunque los primeros predominan de modo manifiesto. Considerados unos y otros, en su conjunto, permiten afirmar que los barbituratos, en lo que respecta a la seguridad con que dan lugar a habituación, están por debajo del alcohol antes estudiado, si bien las

acciones principales de ambas sustancias consisten en una paralización de ciertas funciones del sistema nervioso central. La habitación a los barbituratos se aprecia, ante todo, por sus acciones hipnóticas. Según FITCH (1930), cuando se administra a conejos día sí y día no una dosis determinada de uno de los ácidos butil-etil-barbitúrico, isopropil-bromalil-barbitúrico o isoamil-etil-barbitúrico, se reduce aproximadamente a la mitad la duración del sueño que, en un principio, provocaba dicha dosis. CARMICHAEL y POSEY (1933) informan de resultados análogos obtenidos en cobayos con el ácido etil-metil-barbitúrico; MOIR (1937), con la misma sustancia en ratas, y ETTINGER (1938), en perros; GRUBER y KEYSER (1946), con los ácidos etil-butil-barbitúrico, alil-metil-butil-barbitúrico y etil-metil-barbitúrico en conejos, ratas y perros. Según NICHOLAS y BARRON (1932), las ratas previamente tratadas con el ácido etil-isoamil-barbitúrico necesitan, en ocasiones, doble dosis de la sustancia para conseguir un sueño de análoga profundidad. En todas las investigaciones en animales de experimentación que se han citado, la habitación descrita podía ya demostrarse después de haber recibido los animales tan sólo de una a tres inyecciones. La habitación a los barbituratos parece, pues, que en algunas circunstancias se crea muy rápidamente, e incluso cuando las inyecciones preparadoras están separadas por intervalos hasta de cuatro días. Estos datos también demuestran que se trata de una genuina habitación, en el sentido de nuestra definición, ya que un transcurso de cuatro días debe ser suficiente para eliminar la dosis anterior, con lo que queda excluida la taquifilaxia.

Además, los autores que siguen han observado también la habitación a los barbituratos por *debilitación de la acción hipnótica o narcótica*: HAFNER y WIND (1926) para el ácido dietil-barbitúrico en el renacuajo, BONSMANN (1933, I y II) para el ácido ciclo-hexenil-etil-barbitúrico y ETTINGER (1938) para el ácido dietil-barbitúrico en perros. De la habitación determinada por *acortamiento de la duración del sueño* informan SEEVERS y TATUM (1931) para el ácido dietil-barbitúrico, y OETTEL y KRAUTWALD (1937) para otros diversos ácidos barbitúricos en perros; STANTON (1936) para los ácidos fenil-etil-barbitúrico y etil-metil-butil-barbitúrico en ratas, y CARMICHAEL y POSEY (1936) para el ácido etil-metil-butil-barbitúrico en cobayos. De las investigaciones citadas en este párrafo parece deducirse que la creación de habitación exige algo más de tiempo; en todo caso sus autores nunca informan de que ya hayan observado habitación a los dos o tres días. De resultados enteramente negativos, es decir, de la imposibilidad de demostrar habitación, informan EDDY (1929) para

los ácidos dietil-barbitúrico y ciclohexenil-etil-barbitúrico en gatos, BARLOW (1935) para el ácido etil-metil-butil-barbitúrico, y por RICHTER (1936) para los ácidos dietil-barbitúrico y ciclohexenil-etil-barbitúrico en conejos.

Además de la acción hipnótica se ha estudiado la posibilidad de habituarse a otras acciones de los barbituratos. Según BONSMANN (1932), por ejemplo, se produce muy fácilmente habituación a la acción inhibitoria de la diuresis que ejerce el ácido fenil-etil-barbitúrico. FITCH (1930) ha podido obtener en conejos una alta tolerancia para dosis normalmente letales (para los ácidos metil-etil-barbitúrico, isopropil-bromalil-barbitúrico e isoamil-etil-barbitúrico), y CARMICHAEL y POSEY (1933) informan de elevaciones de la dosis letal para el ácido etil-metil-butil-barbitúrico en cobayos.

Como los barbituratos son medicamentos que poseen diversas aplicaciones y son muy usados, ofrecen extraordinario interés estas dos cuestiones: en primer lugar, el grado hasta el que quepa esperar que la habituación llegue, y, en segundo lugar, en qué punto una habituación adquirida se extiende a otros barbituratos de composición algo diferente (la denominada habituación inespecífica o *crossed tolerance*). Respecto a la primera cuestión, POLISCH y PANSE (1934) manifiestan que la dosis con el tiempo puede elevarse hasta un 200-300 por 100 de la normal para que produzca el mismo efecto. Las investigaciones efectuadas en animales de experimentación [HAFFNER y WIND (1926), FITSCH (1930), NICHOLAS y BARRON (1932), GRUBER y KEYSER (1946)] permiten suponer que la habituación puede elevarse la dosis entre un 100 y un 200 por 100. Por consiguiente, no debe ser muy grande el grado de habituación a los barbituratos. En lo que concierne a la segunda pregunta, se adquiere la impresión general de que una habituación no se limita específicamente a la sustancia con que se trató previamente el organismo, sino que se extiende, aunque en grado desigual, a otros barbituratos.

En alguno de los trabajos citados se expone una breve opinión respecto al *mecanismo de la acción*; sin embargo, en nuestra opinión no se ha aportado base objetiva en apoyo de una u otra teoría. Por tanto, nada más diremos de este punto.

En resumen, puede decirse que la habituación a los barbituratos es posible, pero que no se produce necesariamente. Cuando aparece, suele desarrollarse con relativa rapidez, pero no alcanza un grado elevado.

LA HABITUACIÓN A LA CAFEÍNA.

La experiencia general enseña que un consumo incluso excesivo de cafeína rara vez provoca trastornos graves de la salud. Por esta razón se ha trabajado muy poco en estudiar la habitación a esta sustancia, aunque el problema, precisamente por lo que se ha extendido el consumo de café, tiene importancia práctica general.

Si se investigan las costumbres de los bebedores de café en lo que respecta a las cantidades consumidas, se observa que, en general, no aumentan esencialmente. Ello hace suponer que la habitación a la cafeína, caso de que exista, no debe alcanzar un grado elevado, y, en segundo lugar, que el consumo continuado no debe forzar que suba de un cierto grado. En todo caso, esto parece valer para la habitación a la acción estimulante del sistema nervioso central, acción por la cual, en general, se toman las bebidas que contienen cafeína. La consideración experimental del problema ha demostrado la realidad que corresponde a la opinión expuesta. Se ha observado una habitación poco intensa tanto a ciertas acciones estimulantes del sistema nervioso central como, ante todo, para la acción de elevar la diuresis. Los datos seguros proceden de MYERS (1918 y 1925) y de EDDY y DOWNS (1928). MYERS administró por vía subcutánea, a un grupo de 50 conejos, una inyección diaria de cafeína, comenzando por 0,05 g./kg., y después, en el curso de algunos meses, fué subiendo la dosis paulatinamente hasta llegar a 0,09 g./kg. Estas dosis no ejercían ningún efecto apreciable sobre los conejos. Con las convenientes precauciones, MYERS examinó también en qué grado la administración crónica de cafeína descrita altera la acción diurética de la cafeína, y observó que la dosis mínima diurética, que inicialmente es de 0,0005 g./kg. administrada por vía intravenosa, sube paulatinamente en el curso de cuatro meses hasta, aproximadamente, 0,001 g./kg. La prolongación del tratamiento no eleva el grado de la habitación. Posteriormente, KIHARA (1928), también trabajando con conejos, volvió a describir la habitación a la acción diurética de la cafeína. EDDY y DOWNS (1928) observaron que también en los hombres se produce habitación a la acción diurética; habitación que GÜNZBURG (1922) había ya sospechado. EDDY y DOWNS compararon la sensibilidad a la cafeína en personas que se sometieron a la prueba, y que, por una parte, recibieron regularmente durante un cierto período una bebida que contenía cafeína, y que, por otra parte, durante otro período se abs-

tuvieron de todo consumo de esta sustancia. Observaron que la administración de cafeína continuada durante un mes elevó, por lo menos, al doble la mínima dosis diurética de cafeína.

En experimentos análogos, los mismos EDDY y DOWNS descubrieron habituación a ciertos efectos estimulantes de la cafeína. Para acortar en la misma medida los tiempos de reacción a estímulos de luz, sonido y movimiento, durante los períodos de consumo de cafeína se necesitaban dosis aproximadamente dobles que durante los períodos de abstinencia. WEDEMEYER (1920), para apreciar la acción estimulante de la cafeína sobre la capacidad de trabajo de las personas sometidas a su ensayo, eligió la elevación de capacidad de efectuar sumas. En todo caso creyó apreciar habituación, ya que los "bebedores de café", después de recibir la misma dosis de cafeína, no conseguían la misma elevación del rendimiento que los "abstemios". Sin embargo, la interpretación correcta de los resultados experimentales de WEDEMEYER se dificulta porque no utilizó las mismas personas para los períodos de consumo de cafeína y para los períodos de abstinencia. HORST y colaboradores (1934), en experimentos planteados igual que los de EDDY y DOWNS, han observado el efecto estimulante de la cafeína recurriendo a una prueba de destreza. La cafeína, como es sabido, actúa rebajando la capacidad de efectuar una operación que requiera habilidad manual. El entorpecimiento por efecto de la cafeína era, aproximadamente, igual durante los períodos de consumo de café y de abstinencia; no apreció habituación a la cafeína. En experimentos con animales, HINDEMITH (1938) parece haber logrado habituar ratas al efecto estimulante de la cafeína, medido por la exaltación del metabolismo basal que ella causa. EICHLER y MÜGGE (1932), por el contrario, no pudieron apreciar ninguna habituación en ratas a las que se administró diariamente, por vía subcutánea, 0,1 g./kg. de cafeína, a juzgar por las manifestaciones externas de la estimulación resultante.

Además de la acción diurética y de la estimulante del sistema nervioso central, se ha considerado la habituación a otras acciones de la cafeína. Por ejemplo, según WINSOR y STRONGIN (1933), se descubre habituación en el hombre si se considera la medida de la secreción salivar que la degustación de café estimula por vía refleja en la mucosa bucal. Por el contrario, la ligera elevación de la presión sanguínea que en ocasiones provoca la cafeína, no acusa ninguna habituación [HORST y colaboradores (1934)]. Según experimentos en animales, se ha afirmado en distintas ocasiones que después de un tratamiento previo adecuado con cafeína pueden tolerarse dosis de esta

sustancia que, normalmente, matan. En efecto, según SALANT y RIEGER (1910), la dosis letal para perros habituados a cafeína es un 60-70 por 100 más elevada que para perros normales; en gatos, un 30 por 100, y en conejos, un 15-20 por 100. Según GOUREWITSCH (1907), puede elevarse la tolerancia contra las dosis letales en las ratas y palomas, y, según BOCK y LARSEN (1917), en los conejos.

Mecanismo de acción.

Nada se sabe de los mecanismos a que se debe la habituación a la cafeína. Según GOUREWITSCH (1907), en todo caso no cabe atribuirla a aceleramiento de la destrucción por los tejidos (es decir, a algo parecido a lo que FAUST considera causa de la habituación a la morfina), ya que ni el cerebro, ni el hígado, ni la musculatura de los conejos habituados a la cafeína parece que destruyan *in vitro* esta sustancia. GOUREWITSCH se inclina a considerar que la causa de la habituación sea la reducción de la sensibilidad celular; opinión a la que posteriormente se opusieron BOCK y LARSEN (1917) (aunque sin dar contrapruebas objetivas).

En resumen, hoy puede aceptarse que es posible una habituación a la cafeína que, ciertamente, se mantiene en límites moderados. La habituación que, al parecer, se produce con máxima facilidad, es a la acción estimulante de la diuresis de la cafeína, y algo menos fácilmente a los efectos estimulantes del sistema nervioso central.

LA HABITUACIÓN A LA NICOTINA.

Es una experiencia general que al fumar el primer cigarrillo se experimenta una sensación predominantemente desagradable, y que sólo el uso repetido del fumar transforma dicha sensación en un goce. Puede considerarse demostrado que a la nicotina se deben en buena parte las sensaciones desagradables; asimismo, se ha podido demostrar [JOHNSTON (1942), FINNEGAN y colaboradores (1945)] que—al menos para el 50 por 100 de las personas que fuman mucho—a la nicotina se deben el placer y la necesidad subsiguiente de fumar. Al considerar las causas de la citada alteración del modo de reaccionar al consumo de un cigarrillo deben tenerse presentes las acciones farmacológicas típicas de la nicotina. Consisten en el estímulo de ciertas funciones del sistema nervioso central, que, a concentraciones elevadas, es reemplazado por la paralización de las mismas funciones, y en

la excitación de las sinapsis autónomas, que, a elevadas concentraciones, se transforma también en paralización. Este modo de actuar puede descubrir distintos factores que haya que tener en cuenta al explicar la distinta reacción de fumadores y no fumadores. Por ejemplo, pudiera crearse habituación a las acciones de la nicotina sobre el sistema autónomo o el central a las que se deben las sensaciones desagradables. O, a la inversa, cabe considerar que aumente la sensibilidad ante los componentes de la acción de la nicotina agradables psíquicamente y, con ello, que se reduzcan relativamente las sensaciones desagradables, etc. Puede adquirirse una idea de las distintas posibilidades con el apoyo de los datos siguientes:

JOHNSTON (1942) brindó datos interesantes de la habituación del hombre a la nicotina. Determinó en 35 personas qué cantidad de nicotina había que inyectarles por vía subcutánea para que aparecieran los primeros síntomas tóxicos (consistentes en taquicardia, náuseas, vómitos y, eventualmente, colapso). La dosis límite resultó ser, para los no fumadores, de 1,5 mg.; en cambio, los fumadores habituales soportaron 6 mg. sin que aparecieran síntomas tóxicos. No se administraron dosis más elevadas por razones de seguridad. Los resultados experimentales muestran inequívocamente que el hombre se habitúa con bastante intensidad a ciertas acciones centrales de la nicotina (náuseas y vómitos) y a ciertas acciones autónomas (como taquicardia). REINDELL y WINTERER (1942) no pudieron descubrir, en cambio, nada de habituación a la taquicardia. Es cierto que su modo de efectuar los experimentos era completamente distinto del de JOHNSTON, ya que las personas sometidas a experimento habían de fumar en los días de ensayo 14-20 cigarrillos en los momentos que ellas quisieran; para apreciar la frecuencia del pulso se admitió un valor promedio que no guardaba ninguna relación determinada con la cantidad de nicotina recibida. Procediendo de modo distinto, WINSOR y RICHARDS (1935)—cuyo trabajo no hemos podido consultar en el original—han podido también apreciar la habituación a la nicotina. Las personas sometidas a su experimentación tenían que procurar mantener lo más inmóvil posible un vástago dentro de una caja de forma conveniente, de modo que no se produjera ningún contacto. Cada contacto se registraba automáticamente y contaba como falta. Dichas personas (en general no fumadores) sólo tenían que fumar durante una semana, a lo largo de la cual eran examinadas del modo descrito. Se observó que, inmediatamente antes de un cigarrillo, el número de faltas solían ser 2-5 por minuto, número que creció en el transcurso del primer día de experimentación hasta elevarse a 80. Pero a partir

del segundo día fué reduciéndose el número de faltas paulatinamente, de modo que en el transcurso de tres semanas sólo se elevaba poco por encima que al comienzo de la prueba. Ya—aunque se prolongue el tiempo de fumar—no se consigue un progreso ulterior. El ensayo parece demostrar que el hombre se habitúa con bastante intensidad a cierta acción estimulante de la nicotina.

Los experimentos en animales también demostraron la habitación a la nicotina: ESSER (1903) administró a perros nicotina diariamente durante meses. Los animales, al principio, reaccionaban a dosis de unos 0,01 de mg. administradas por vía subcutánea, con manifiesta excitación (inquietud); pero con el tiempo pudieron soportar cantidades de 0,2, sin que por ello aumentara la excitación. En cambio, la taquicardia no ofreció el mismo grado de habitación; en efecto, los perros reaccionaron a las dosis crecientes de nicotina con aceleración mayor del pulso, y al fin del periodo de experimentación siguen ofreciendo, horas después de la inyección, fuertes palpitaciones. También parece posible cierta habitación a las acusadas acciones tóxicas de la nicotina. BEHREND y THIENES (1933) determinaron en ratas blancas la cantidad de nicotina que, administrada por vía subcutánea, provoca parálisis de las patas posteriores (0,00025 a 0,0005 g./kg.). En curso de administración diaria de nicotina, a los ocho días ya se produce habitación, por lo que la dosis límite necesaria para provocar el fenómeno que en él se la aprecia llega a alcanzar un valor triple del normal. Es cierto (y a nosotros nos parece digno de mención especial) que esta habitación sólo se observa en animales jóvenes en periodo de crecimiento; en efecto, las ratas de más de sesenta días ya no se habitúan. DIXON y LEE (1912), en el conejo, y KOBAYSHI (1936), en el ratón, han observado cierta habitación a las acciones estimulantes de la nicotina; en cambio los gatos, al parecer, no manifiestan esta habitación [EDMUNDS (1904, 1909)]. Según HATCHER (1904), en los conejos también puede elevarse la dosis letal por la administración repetida de nicotina.

Mecanismo de acción.

Está poco investigado el mecanismo a que se debe la habitación a la nicotina. DIXON y LEE (1912) observaron que el hígado y el cerebro de conejos no habituados destruye más rápidamente *in vitro* la nicotina que se les añade, que los correspondientes órganos de conejo normal. Como, al parecer, la destrucción acelerada no requiere que las células estén intactas, sino que también se descubre usando

una papilla de los órganos correspondientes, los autores citados opinan que se trata de la activación de una reacción enzimática. Actualmente no puede decidirse en qué proporción influye esta destrucción acelerada en la habituación a la nicotina. Pero cabe opinar que la influencia de este factor sobre la habituación a la nicotina es, en todo caso, mayor que la que ejerce la destrucción acelerada de la morfina en la habituación a la morfina; y precisamente porque, ya normalmente, el hígado posee una gran capacidad de destrucción de la nicotina. El hombre, como es sabido, puede tomar diariamente nicotina en una cantidad que sea un múltiplo de la dosis mortal del alcaloide, con tal que dicha dosis diaria se distribuya a lo largo de todo el día.

La opinión, aún muy extendida, de que el hecho de que los fumadores habituados puedan fumar más cantidad, se debe, ante todo, a que absorben menos completamente la nicotina, es, con seguridad, inexacta. Precisamente, según los mencionados experimentos de JOHNSTON, el fumador también resiste, en inyección, una dosis mayor de nicotina que el no fumador.

En resumen, puede decirse que en el hombre es posible la habituación a la nicotina (ante todo a ciertas acciones estimulantes del sistema nervioso central). En su virtud, pueden tolerarse cantidades diez veces mayores. La habituación parece que puede desarrollarse en breve tiempo (de días a semanas). En opinión de DILLER (1929), desciende algo en la edad avanzada.

LA HABITUACIÓN A LA HISTAMINA.

Desde que a la histamina, o a sustancias análogas desde los puntos de vista químico y farmacológico—las denominadas sustancias "H"—, se les ha atribuido importancia patofisiológica e incluso fisiológica, se ha planteado con cierta urgencia si es posible cierta habituación a la histamina, y, en caso afirmativo, en qué circunstancias se produce. Por ejemplo, parece que a tales sustancias "H" deben atribuirse ciertas formas de dolores de cabeza [HORTON y colaboradores (1939)]; como acción compensadora frente a la acción de la adrenalina, el organismo puede liberar sustancias "H" [STAUB (1946)]; en ciertos tipos de dolor deben funcionar como sustancias transmisoras de la excitación [ROSENTHAL y MINARD (1939), KWIATKOWSKI (1943)]; en ciertas enfermedades alérgicas (especialmente en la fiebre del heno y en la urticaria aguda, en las que, como es sabido, los antihistamínicos actúan de modo tan extraordinariamente

favorable) deben formarse sustancias "H", responsables de algunos de sus síntomas. La concepción últimamente citada es la que, en especial, ha inducido a estudiar cómo habituar el organismo a la histamina por repetida administración de esta sustancia, para conseguir que, cuando hayan de aparecer en el organismo grandes cantidades de sustancias "H", éstas provoquen menos efecto. Se han ideado distintos métodos, con los que se pretende haber logrado este propósito. Los datos de los clínicos respecto a la utilidad de esta terapéutica no son, hasta la fecha, coincidentes [puede encontrarse extensa bibliografía de este asunto en FEINBERG (1946)]. Por todo lo cual parece de interés establecer, ante todo experimentalmente, hasta qué punto es posible la habituación a la histamina.

Los primeros datos seguros de habituación, aunque de intensidad moderada, son—en opinión nuestra—los comunicados por HORTON y colaboradores (1939), después de haber admitido KARADY (1936) la habituación a la acción reductora de la presión sanguínea en el gato. HORTON y colaboradores trataron hombres administrándoles diariamente, durante semanas, 0,00005-0,0001 g. de histamina. Como índice de la sensibilidad a la histamina se utilizaron las medidas del eritema, de la pápula y del halo rojo (de la conocida triada de LEWIS), que aparecen al inyectar histamina por vía intracutánea. A juzgar por este ensayo, se reduce manifiestamente la sensibilidad a la histamina de las personas en tratamiento. Los mismos autores observaron que por el tratamiento con histamina se reduce la sensibilidad de los cobayos frente a cantidades tóxicas de histamina, observación confirmada posteriormente por KARADY (1941). Este autor administró por vía subcutánea a cobayos, de dos en dos días, cantidades crecientes de histamina, hasta llegar a 0,001 g/kg., dosis que, a continuación, mantuvo inalterada durante tres semanas. Al cabo del período de tratamiento se determinó la dosis letal media; alcanzó 0,0035 g/kg., administrada por vía subcutánea, y 0,0005 por vía intracardiaca. Para los animales testigos que, aparte del tratamiento por histamina, se habían cuidado del mismo modo, las dosis letales fueron de 0,0018 g/kg. por vía subcutánea, y 0,00022 g/kg. por vía intracardiaca. Los cobayos también se habitúan a la histamina cuando la respiran como aerosol. [BUCHER (1949)]. El espasmo bronquial provocado de esta forma resultó más débil (es cierto que en grado escaso, pero determinable, con seguridad, estadísticamente), cuando los animales se han tratado previamente diez días con histamina. También puede considerarse seguro que los ratones se habitúan a ciertas acciones de la histamina [FABINYI y SZEBEHELYI (1948)]. Los ratones normales sufren un descenso de

temperatura de 3°-4° durante unas dos horas, a consecuencia de una inyección subcutánea de 0,1 g/kg. de histamina. Si se repite diariamente este tratamiento, se observa que paulatinamente decrece el descenso de temperatura, y que al cabo de doce días ya no se aprecia ninguno. Por el contrario, el descenso de temperatura que provoca una inyección subcutánea de 0,5 g/kg. de acetilcolina persiste como antes de iniciar el tratamiento expuesto.

Frente a estos datos positivos de habituación experimental a la histamina hay que oponer los resultados de WELLS y colaboradores (1942), que no pudieron apreciar en perros habituación, utilizando como índice de sensibilidad para la histamina la estimulación de la producción gástrica de ácido clorhídrico. Este resultado negativo nos parece especialmente interesante porque, precisamente la estimulación de la producción de ácido clorhídrico, tiene una cierta posición singular entre las acciones de la histamina. Sólo queremos recordar que esta acción de la histamina, en oposición a otras de sus acciones, apenas puede influirse antagónicamente por antihistamínicos. De esta contraposición tal vez pueda resultar alguna indicación del mecanismo a que se debe la habituación a la histamina. Por lo demás, puede decirse que, hasta la fecha, no se conoce nada acerca del mecanismo de la habituación a la histamina.

En resumen, puede decirse que una habituación a ciertas acciones de la histamina puede desarrollarse en un período relativamente breve, pero que esta habituación sólo alcanza un grado muy pequeño. Este es, pues, el motivo por el que se haya conseguido rara vez éxito y éxito inseguro en el tratamiento de las enfermedades alérgicas por la habituación a la histamina (consúltese pág. 48). Téngase en cuenta que una reducción de la sensibilidad a la histamina incluso a la mitad no bastaría para evitar de modo apreciable los efectos de una aparición masiva de sustancias "H".

HABITUACIONES A OTRAS SUSTANCIAS.

La habituación del hombre y de los animales a la administración por vía entérica de *arsénico* en polvo fué, durante mucho tiempo, objeto de estudios extensos [véase una revisión de la literatura concerniente en HEFFTER y KEESER (1927)]. Desde las investigaciones de CLOETTA (1906) y de JOACHIMOGLU (1916), la habituación se refiere concretamente a la de la mucosa del estómago, a la acción estimulante de la inflamación que ejerce el arsénico, de modo que la absorción

(que, en sí misma, podía estar acelerada por las alteraciones inflamatorias) va reduciéndose paulatinamente. La importancia práctica de esta habituación debe ser, sin embargo, pequeña.

Muy diverso es lo observado acerca de la habituación a acetanilidas. Así, PAYNE (1935) observó en perros disminución de la toxicidad, y STANTON y AGRICOLA (1937), en ratas, reducción de la actividad analgésica, mientras que, por el contrario, SMITH y HAMBOURGER (1936) no pudieron apreciar en ratas ninguna habituación a la acción anti-pirética, ni SMITH (1940), en monos, a la acción analgésica.

Incidentalmente ha sido también descrita la habituación a *estricnina* [HALE (1909), BIELER (1935)], a *atropina* [CLOETTA (1911)], a *nitroglicerina*, y, muy recientemente, ROTHLIN (1948) informa que los gatos pueden habituarse, en ciertas condiciones, a los *glucósidos cardíacos* por repetido tratamiento con grandes dosis de estas sustancias. Los animales muestran inicialmente pérdida de peso, electrocardiograma tóxico y estado general malo; pero se recuperan con el tiempo, a pesar de un tratamiento ulterior.

Es probable que sea posible la habituación (siquiera sea en pequeño grado) a muchas otras sustancias, como ordinariamente se admite. Pero, cuando una habituación no alcanza un cierto grado—si se consideran las diferencias individuales de la sensibilidad para la sustancia correspondiente—, debe carecer de toda importancia práctica.

CAUSAS DE LA HABITUACION:

Todas las teorías de la habituación, si pretenden poseer validez general, han de poder explicar de modo satisfactorio dos fenómenos que siempre se observan en la habituación, a saber: el fenómeno de la “desigual habitabilidad a diversas acciones” y, en segundo lugar, el fenómeno de la “habituación inespecífica”.

HABITUABILIDAD DESIGUAL A DISTINTAS ACCIONES.

Con ocasión de hablar de la habituación a determinadas sustancias que producen hábito (véase antes), hubo de señalarse circunstancialmente que cuando una sustancia ejerce varias acciones, la habituación puede no manifestarse con igual intensidad para todas. Hemos de dar por probado la posibilidad de estas diferencias, ya que, indudablemente, ha podido observarse en distintos casos la desigual

habituabilidad frente a distintas acciones de la misma sustancia en el mismo organismo y por el mismo investigador. Por ejemplo, ESSER (1903) logró habituar muy claramente perros a las acciones estimulantes del sistema nervioso central de la nicotina, pero apenas a la acción estimulante del pulso. VAN EGMOND (1911) informa de un perro que se habituó intensamente a la acción narcótica de la morfina, de modo que soportaba la administración diaria de 1 g. por vía subcutánea sin señales de sueño; sin embargo, la acción retardadora del pulso ejercida por la morfina mantenía la intensidad del comienzo del experimento; es decir, que el perro seguía reaccionando con fuerte retardo del pulso al recibir 40 mg. de morfina. VAN DONGEN (1915) ha podido igualmente habituar con gran facilidad perros a la acción retardadora de la respiración ejercida por la morfina; sin embargo, en los mismos animales, apenas se apreciaba habituación a la acción retardadora del pulso. MILLER y PEANT (1926), SCHMIDT y LIVINGSTON (1933) y otros autores habituaron muy fácilmente perros a las acciones depresivas del sistema nervioso central ejercidas por la morfina, pero apenas a las acciones gastrointestinales. EDDY y REID (1934), entre otros autores, pudieron observar que también los monos se habitúan a las acciones depresivas del sistema nervioso central ejercidas por la morfina mucho más rápidamente que a las acciones retardadoras del pulso o de la respiración; lo mismo observaron en perros TATUM, SEEVERS y COLLINS (1929); JOEL y ETTINGER (1926) lograron habituar ratas al componente narcótico de la morfina, pero no al estimulante.

La diversa habituabilidad para distintas acciones parece obedecer a ciertas leyes generales. Así, por ejemplo, las acciones sobre sistema nervioso central originan habituación mucho más fácilmente que las acciones autónomas. De las primeras—al menos así sucede con la morfina—, las acciones paralizantes del sistema nervioso central crean, en general, mucho más fácilmente habituación que las estimulantes del mismo sistema. En ello han coincidido casi todos los investigadores en observaciones en casi todas las especies examinadas. En particular, el gato se habitúa sólo con dificultad y en circunstancias muy especiales a la acción estimulante de la morfina [sólo lo ha conseguido; que sepamos, GOLD (1929)]; mientras que, por ejemplo, el ratón, al parecer, se habitúa fácilmente a esta acción [NEDZEL (1937), EDDY (1941)]. También se ha observado que la habituación a las acciones tóxicas graves (apreciada por la dosis letal) sólo se produce raramente y, además, en pequeño grado. Por ejemplo, los perros se habitúan muy intensamente a la acción retardadora de la respiración

de la morfina y, sin embargo, no aumentan su resistencia para la morfina, a juzgar por la dosis letal; de modo que hay que deducir, en primer lugar, que la acción retardadora de la respiración normalmente no es la causante de la muerte de los perros por efecto de la morfina, y, en segundo lugar, que la acción que es causa efectiva de la muerte no origina habitación. En nuestra opinión, puede también explicarse que, en determinadas circunstancias, a pesar de la habitación a ciertas acciones, pueda, por el contrario, incluso haberse elevado la toxicidad total de la sustancia en cuestión. Esto es lo que posiblemente se produce en el experimento de JOEL y ETINGER (1926). Estos autores pudieron habituar ratas al componente de acción paralizante del sistema nervioso central (narcótico) de la morfina; sin embargo, los animales habituados de tal modo ofrecen en su conjunto menor resistencia frente a la morfina. Los autores explican el hecho por la hipótesis de que el componente estimulante del sistema nervioso central de la acción de la morfina debe ser el responsable de la muerte; pero que tal componente no es habituable y que, por consiguiente, acusa, aparentemente, su efecto debido a que por el debilitamiento de las acciones paralizantes (habitables en cambio), cesan, en parte, las acciones que compensan normalmente la excitación (consúltese también la teoría de la morfina de TATUM y colaboradores).

HABITUACIÓN INESPECÍFICA.

Bajo la designación de "habitación inespecífica" (*"unspezifischer Gewöhnung"* en alemán, *"crossed tolerance"* en inglés) se entiende en general el fenómeno de que un organismo por habitación a una sustancia se modifique de modo que muestre también cierta tolerancia para algunas acciones de otras sustancias. Un conocido ejemplo lo constituye la experiencia general de que la narcosis de los alcohólicos requiere más éter que la de los hombres normales.

Muchos casos de habitación inespecífica descritos en la literatura se refieren a acciones de sustancias que poseen una constitución química análoga a la causante de la habitación. A este primer grupo pertenecen, por ejemplo, los descubrimientos de AHLQUIST y DILLE (1940), que para provocar en conejos una narcosis de intensidad determinada necesitaron, por término medio, 10,87 ml. de éter por kg. de peso animal; después de efectuar una habitación al alcohol, el éter requerido por los mismos animales para conseguir el mismo efecto subió a 1,28 ml/kg. Según GRUBER y KEYSER (1946), la habitación

de los perros al ácido butil-etil-barbitúrico (apreciado por la duración del sueño) se extiende; aproximadamente, con la misma intensidad a otros derivados del ácido barbitúrico. MYERS (1925) observó que los conejos habituados a la acción diurética de la cafeína reaccionaban con intensidad también manifiestamente menor a la teobromina y a la teofilina, observación confirmada en el hombre por EDDY y DOWNS (1928). MYERS (1916) observó que los perros habituados al componente retardador de la respiración de la morfina reaccionaban también más débilmente a la acción retardadora de la respiración de la heroína y de la codeína. JOEL y ETTINGER (1926) pudieron apreciar que las ratas habituadas a la acción narcótica de la morfina poseían también menos sensibilidad para las acciones narcóticas de la codeína, dihidro-oxi-codeinona (Eucodal), dihidro-codeinona (Dicodid) y dihidro-morfina (Dilaudid). Observaciones análogas aparecen en otras muchas comunicaciones; por ejemplo, las de DOWNS y EDDY (1928), KOLB y DU MEZ (1931), CO TUI (1931) y otros.

Pero en otros muchos casos no existe semejanza química entre la sustancia a la que se habituó el organismo y aquellas a las que se extiende la habituación específica creada por la primera. A este segundo grupo de habituación inespecífica pertenecen, por ejemplo, las observaciones de EDMUNDS (1909), que pudo observar que los perros habituados a la acción emética de la nicotina ofrecen también mayor resistencia a la acción emética de la lobelina. Según TOYOSHIMA (1929), los ratones habituados al alcohol manifiestan también menor sensibilidad—medida por las acciones narcóticas—para el hidrato de cloral, el etiluretano y el ácido dietil-barbitúrico. Los conejos por habituación al alcohol se hacen más resistentes al ácido etil-metil-butil-barbitúrico, a juzgar por la duración del sueño [AHLQUIST y DILLE (1940)]. Según MORAWITZ y PRATT (1908), los hematíes de conejos tratados previamente con fenilhidracina pueden haber adquirido una resistencia más alta no sólo contra la acción hemolizante de la fenilhidracina, misma, sino contra la de otras sustancias diversas, como saponinas, éter, agua destilada, etc. HORTA (1933) observó que los perros habituados al componente narcótico de la morfina han reducido también su sensibilidad para las acciones narcóticas del ácido dietil-barbitúrico. Y, según SAITO (1937), los cultivos *in vitro* de fibroblastos de gallina habituados a la acción inhibitoria del crecimiento de la morfina ofrecen también menos sensibilidad no sólo frente a la correspondiente acción producida por sustancias análogas a la morfina, como codeína, tebaina y dihidrooxicodeinona, sino también frente a la misma acción provocada por la papaverina y la narcotina, es decir,

por dos alcaloides derivados de la isoquinolina muy distintos, en cuanto a estructura química, de la morfina. También nos parecen muy instructivas las observaciones efectuadas en hombres morfímanos por ISBELL y colaboradores (1948): Determinaron hasta qué grado, por una parte, les proporciona euforia y, por otra parte, impide la aparición de los síntomas de abstinencia, la administración a los morfímanos, sin que lo sepan, en lugar de la inyección habitual de morfina, de una del producto sintético 6-dimetil-amino-4, 4-difenil-3-heptanona (Amidona) de enérgica acción analgésica. Observaron que a ambos respectos la morfina, tan distinta químicamente de la Amidona, se deja sustituir, sin embargo, por ésta.

En un principio el fenómeno de la habitación inespecífica se intentó explicar por una semejanza química de las sustancias implicadas en ella. Después de los ejemplos expuestos en el párrafo anterior, no puede ya considerarse correcto este punto de vista. Lo que sea común a toda habitación específica, y por ende la explicación de ella, parece que debe buscarse menos en el lado químico que en el funcional, es decir, en el organismo. Y así se explica que, en casi todos los casos de habitación inespecífica, ésta se haya observado ante todo en las acciones para las cuales existe también habitación específica; es decir, por ejemplo, que los hematíes hechos más resistentes a la acción hemolítica de la fenilhidracina resistan también mejor las influencias hemolíticas de otras sustancias, etc. Aunque no pueda negarse que existan excepciones a esta regla, debe opinarse, sin embargo, que el mecanismo en que se basa la habitación inespecífica está íntimamente relacionado de un modo u otro con la acción de la sustancia correspondiente.

Algunos colaboradores de AMSLER han observado una forma, al parecer singular, de habitación inespecífica. Según SMILGA (1933), el cobayo por habitación al alcohol reduce enérgicamente la actividad anestésica local de la cocaína, determinada por la duración de la anestesia de la córnea. BALODIS (1933) ha descrito el mismo fenómeno para otros anestésicos locales, y, posteriormente, BALODIS (1934) también ha informado de un acortamiento análogo de la acción midriática local causada por instilación de adrenalina. Sin embargo, OELKERS (1935) no ha podido reproducir las observaciones de SMILGA.

LA HABITUACIÓN: CONSIDERADA COMO FENÓMENO DE ADAPTACIÓN.

Si consideramos los distintos descubrimientos y opiniones aducidos en la exposición anterior contrastándolos entre sí, aparecen siempre tres puntos que, por ello, deben poseer fundamental importancia para comprender los fenómenos de habituación. Constituye el *primero* el dato de que para el desarrollo de una habituación no parece ser tan importante la sustancia a que hay que habituar, como las acciones provocadas por esta sustancia. Esta impresión se apoya en que distintas acciones ejercidas por una misma sustancia pueden ofrecer grados sumamente distintos de habituación (consúltese pág. 50), y también en que las mismas acciones provocadas por sustancias químicamente distintas puedan ofrecer el fenómeno de la habituación inespecífica (véase pág. 52), y, finalmente, en pruebas experimentales directas, como las mencionadas en la página 21 (BUCHER). El estado mismo de habituación parece consistir en que la acción de una determinada dosis de una sustancia no posee ya la misma intensidad. El *segundo punto* consiste en que la habituación parece ser una función activa del organismo. En este sentido habla el hecho de que los organismos "envenenados", que han recibido una dosis demasiado elevada de la sustancia correspondiente, ya no ofrecen el fenómeno de la habituación (véase pág. 22). Por último, el *tercer punto* consiste en el hecho de que el organismo sólo puede capacitarse para esta función paso a paso, es decir, después de transcurrido cierto tiempo (véase página 20).

Los tres puntos citados nos llevan a opinar que el debilitamiento de una acción, a consecuencia de una habituación, en primer lugar no consiste sino en una regulación del organismo compensadora de la acción correspondiente, regulación compensadora que se va haciendo más eficaz a consecuencia del ejercicio repetido de dicha acción. Cuando un organismo normal, equilibrado en sus distintas funciones, recibe por primera vez una sustancia en una dosis que provoca en él una acción manifiesta, frente a ella reacciona el organismo como un todo. Es decir, el organismo intenta compensar la acción perturbadora por medidas opuestas, compensadoras, que actúan de modo conveniente. Si las sustancias se administran repetidas veces a lo largo del período relativamente prolongado que requiere la habituación de un organismo, es evidente que con la misma frecuencia se provocan las medidas compensadoras del organismo. Pero la contrarregulación es una

función del organismo, y siempre que un organismo ha cumplido, de un modo repetido o creciente, una función, se adapta a ella, por ejemplo, porque encuentra los elementos necesarios para cumplirla en mayor número o los preexistentes más desarrollados, etc. En todo caso no sabría decirse por qué el organismo en este caso habría de reaccionar de otro modo que, por ejemplo, cuando hipertrofia un músculo por su ejercicio mecánico. Hay, pues, que admitir que el organismo, en el transcurso de un experimento de habitación, va desarrollando una regulación compensadora de capacidad funcional creciente. Según esta concepción, la habitación no debe considerarse como una modificación cualitativa del modo de reaccionar; parece más bien deberse de modo exclusivo a posibilidades de reacción ya activas o preformadas que pueden reforzarse de modo cuantitativo. Pero como el reforzamiento no alcanza por igual a todos los mecanismos de que, en último término, se compone la regulación compensadora, en ocasiones puede confundirse con una alteración cualitativa.

La opinión de que la causa de los fenómenos de habitación, pudiera ser una "regulación compensadora reforzada por el ejercicio", fué ya puesta por VOLLMER (1932, 1934) y VOLLMER y RICHTER (1940). Y cuando GOLBERG (1943) opina que los bebedores de alcohol lo soportan mejor, ante todo por haber aprendido "a compensar mejor psíquicamente sus acciones", toma la expresión concreta de la idea de la regulación compensadora. En el fondo de la teoría de la morfina de TATUM, SEEVERS y COLLINS (1929) parece encontrarse también que se consideran las "acciones compensadoras" como causa genuina de la habitación (véase pág. 30); es cierto que allí las acciones compensadoras no se consideran como regulaciones compensadoras propiamente dichas del organismo, sino como acciones directas de la morfina.

La concepción de que la habitación consiste en la regulación compensadora hecha especialmente eficaz a consecuencia de su puesta en marcha repetidas veces, sólo nos habla, evidentemente, de los rasgos fundamentales de los fenómenos de habitación. No basta para explicar los mecanismos detallados que juegan en una de tales regulaciones compensadoras; dicho con otras palabras, no resuelve el problema de la última causa, concreta, de cada caso particular de habitación. Es de suponer que la regulación compensadora, en cada caso, ha de consistir en un mecanismo enteramente distinto. De las opiniones emitidas en los apartados dedicados a las distintas sustancias que crean habitación parece deducirse que los mecanismos hu-

morales han de tenerse en cuenta más raramente que los mecanismos celulares.

Queremos salir al encuentro de una objeción que, tal vez, pudiera hacerse a la concepción de la habituación considerada como regulación compensadora activada: sabido es que, aunque exista fuerte habituación a la acción de una sustancia, no se da forzosamente habituación inespecífica para acciones formalmente iguales ejercidas por otras sustancias. Este hecho no puede valer como objeción firme, pues hemos de admitir que acciones que se nos impongan como "iguales" pueden no estar compuestas en todos los detalles de componentes de acción idénticos; pero la aparición de una habituación inespecífica se comprende que ha de depender precisamente de si en la otra acción intervienen y en qué grado lo hacen las regulaciones compensadoras en que se basa la habituación. Deseamos explicar lo dicho, considerando teóricamente el experimento descrito en la página 21, concerniente a la habituación de cobayos a un aerosol de histamina.

En nuestra opinión, en este experimento de la habituación se ofrecen cuatro explicaciones posibles. Puede admitirse, en primer lugar, una regulación compensadora, ciertamente causal, simultánea, pero sólo local. Tal sería aquí el caso, si el aumento de tolerancia para el aerosol de histamina fuera debido, por ejemplo, a que se dispusiera, en el mismo lugar de la acción, de mayor cantidad de histaminasa formada específicamente. De ser cierto, habría que esperar que los cobayos sólo se hicieran más resistentes de modo selectivo frente a un espasmo bronquial provocado por histamina. En segundo lugar, habría que considerar una acción compensadora también causal, pero generalizada. Tal sucedería cuando, por ejemplo, la histaminasa necesaria para la destrucción local de la histamina fuera facilitada por un centro de producción de histaminasa situado en otro lugar que la cediera en cantidad mayor. De ser así, habría que esperar que se creara también mayor tolerancia para otras acciones de la histamina (por ejemplo, para el ensanchamiento de los capilares provocado por la histamina). En tercer lugar, sería posible una regulación compensadora, sintomática, simultánea, pero sólo local. Tal sería el caso si la habituación del organismo al espasmo bronquial provocado por la histamina se debiera, por ejemplo, a que en las terminaciones adrenérgicas de la mucosa de los bronquios se liberara una mayor cantidad de simpatina y que, por ésto, se llegara sintomáticamente a una relación compensadora de los músculos bronquiales. De ser ésta la explicación verdadera, habría que esperar una elevación de la tolerancia para espasmos bronquiales provocados de modo distinto (por ejemplo, para un espasmo bronquial por la acetilcolina). Finalmente, en cuarto lugar, hay que considerar la posibilidad de una regulación compensadora sintomática, pero que resultara ser generalizada. Este caso se daría si el relajamiento sintomático de los músculos bronquiales no se debiera al aumento de la cantidad de simpatina liberada en el mismo lugar, sino, por ejemplo, a que las cápsulas suprarrenales cedieran adrenalina, más fácilmente. En consecuencia habría que esperar que eventualmente existiera una mayor tolerancia contra una multitud de sustancias—o mejor contra sus acciones—, cuyas acciones normalmente se compensaran por descargas de adrenalina. Pudiera, por ejemplo, elevarse la tolerancia a la acción de ensanchar los capilares ejercida por la histamina, pero, simultáneamente, también contra la misma acción ejercida por cualquier otra sustancia. En estos ejemplos hemos deta-

llado una regulación compensadora posible de cada una de las cuatro clases típicas; no es necesario decir que en cada una de las clases pueden existir otras muchas posibilidades. Esta consideración teórica puede darnos idea de cuáles son las condiciones previas que deben cumplirse para que se produzca una habituación inespecífica.

La teoría que considera la habituación, fundamentalmente, como consecuencia de una regulación compensadora activada del organismo, explica también otras ciertas formas de alteraciones de sensibilidad en organismos habituados que, si no, no podrían ponerse fácilmente en relación con la habituación. Así, por ejemplo, VOLLMER (1932, 1934), en ratones que había habituado al alcohol etílico, ha podido observar, en pruebas de toxicidad, que poseían mayor sensibilidad que los animales testigos para la colchicina y la hidroquinona. Se trata de una observación peculiar, en primer lugar, porque las sustancias en cuestión, alcohol por una parte y por otra colchicina e hidroquinona, desarrollan acciones completamente distintas (la primera actúa como narcótico y las últimas como estimulantes); pero se explica fácilmente si admitimos que una regulación compensadora (1) del organismo del ratón contra la administración crónica del alcohol consiste en quemar—oxidar—el alcohol con mayor rapidez. Esta opinión no parece apartarse de la realidad porque ya se han mencionado pruebas en la página 36 (PRINGSHEIM y otros) según las cuales en la habituación al alcohol debe también estar aumentada la capacidad de oxidarlo; estas pruebas se efectuaron precisamente en roedores (ratas). Ahora bien, en la exaltación de la capacidad de oxidar el alcohol deben participar más o menos todos los tejidos, porque, como es sabido, el alcohol actúa como fármaco poco diferenciado, y puede provocar casi a las mismas concentraciones acciones sobre todos los tejidos. Ahora bien, la hipótesis de una exaltación de la capacidad de oxidación de los tejidos podría explicar la razón por la que los animales se hacen más sensibles a la colchicina y a la hidroquinona. Los productos de oxidación de ambas sustancias, como es sabido, resultan más venenosos en experimentos de toxicidad aguda que la colchicina y la hidroquinona, respectivamente. Por otra parte, CAHEN (1935, 1936) habituó conejos a morfina, y pudo demostrar que los animales así preparados reaccionan a una inyección intravenosa de levadura de cerveza con mayor elevación de temperatura que los ani-

(1) Señalemos que aquí no planteamos la discusión de si es la única; provisionalmente nos inclinamos a considerarlo improbable.

máes 'testigos' correspondientes. *A priori* parece difícil establecer una relación causal entre este descubrimiento y la habituación a la morfina. Pero no parece tan improbable si se recuerda que una inyección de morfina provoca en conejos normales un descenso de temperatura que no se observa en los habituados al alcaloide [CAHEN (1936, II)]. Basta dar un nuevo paso y admitir que en el estado de la habituación desaparecen los descensos de temperatura por la sola razón de que se efectúan con más facilidad las regulaciones de compensación por haberse ejercitado repetidamente. Por ello el estado de equilibrio que normalmente existe entre los mecanismos que tienden a reducir la temperatura y los que tienden a elevarla debe estar desplazado en favor de los últimos; así se consiguen explicar con unidad las observaciones aparentemente inconexas de CAHEN.

Si los mecanismos a que se deben las distintas habituaciones se consideran, en general, como medidas de regulación compensadora del organismo, hechas paulatinamente más eficaces, ello equivale a ver en la habituación un *fenómeno de adaptación* del organismo. Es fácil concebir la finalidad de tal adaptación. Mediante ella deben contrarrestarse las perturbaciones que, en la repetida administración de ciertas sustancias, serían provocadas siempre por las acciones de éstas. Por consiguiente, que una habituación sea más o menos acusada, dependería sencillamente de que los mecanismos en que se basa la regulación compensadora correspondiente fueran capaces de adaptarse a un trabajo más intenso. De ser éste el caso, se requiere como condición previa que el ejercicio diario del mecanismo contrarregulador exalte su eficacia, es decir, que conduzca a hiperfunción, a "hipertrofia".

La habituación considerada como un fenómeno de adaptación, en nuestro sentir, puede ilustrarse de modo singularmente intuitivo por el ejemplo de habituación, antes mencionado, de LENDLE. Este autor, por el mantenimiento de ranas en un medio que contenía alcohol, consiguió habituarlas, lo que, al parecer, tenía como causa la disminución de la permeabilidad de su piel para el alcohol, debido a lo cual se impedía que penetrara en su organismo una sustancia tóxica para éste. También nos parece especialmente ilustrativo, en cierto respecto, el ejemplo, también ya mencionado, de BEREND y THIENES. Estos autores, como es sabido, habituaron a la nicotina ratas en período de crecimiento, pero no consiguieron habituar las adultas. No parece inverosímil admitir que los individuos jóvenes sean más capaces de adaptación que los adultos.

No podemos compartir la concepción de ciertos autores (AMSLER, STARKENSTEIN), según la cual la habituación revela un envenenamiento crónico del organismo, y no en último lugar, porque puede demostrarse la existencia de habituación sin que la sustancia habituable haya de subsistir en el organismo.

En el caso de la habituación a un estímulo, el organismo no sufre ningún daño, y el estímulo no desaparece. El organismo simplemente se acostumbra a él. Esto puede verse en el caso de la habituación a un estímulo débil, como el ruido de un reloj, o a un estímulo fuerte, como el dolor. En ambos casos, el organismo simplemente se acostumbra a él, y el estímulo sigue existiendo.

La habituación a un estímulo débil puede verse en el caso de un niño que se acostumbra al ruido de un reloj. El niño simplemente se acostumbra al ruido, y el ruido sigue existiendo. La habituación a un estímulo fuerte puede verse en el caso de un niño que se acostumbra al dolor. El niño simplemente se acostumbra al dolor, y el dolor sigue existiendo.

En el caso de la habituación a un estímulo débil, el organismo simplemente se acostumbra a él, y el estímulo sigue existiendo. En el caso de la habituación a un estímulo fuerte, el organismo simplemente se acostumbra a él, y el estímulo sigue existiendo.

CAPÍTULO II

ELEVACION INDUCIDA DE LA RESISTENCIA DE PRO- TISTAS FRENTE A SUSTANCIAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO Y MICROBICIDAS

ELEVACIÓN DE LA RESISTENCIA "IN VITRO".

a) *Las primeras observaciones y su importancia.*

Mucho antes de que PAUL EHRLICH definiera el concepto de firmeza ante un medicamento (de elevación de la resistencia *in vivo*) y le diera una segura base experimental con sus investigaciones en protozoos patógenos, se habían efectuado ya gran número de observaciones concernientes al hecho de que los organismos unicelulares pueden habituarse, hasta cierto grado, en el tubo de ensayo a sustancias inhibidoras del crecimiento o microbicidas. W. HAUSMANN (1907) resumió los datos, reunidos hasta aquella fecha, de la resistencia a venenos de bacterias, levaduras, mohos y prozoos, y su informe permite ver que en aquella época ya se había intentado, en parte con éxito, conseguir concepciones concretas acerca de las causas de la modificación de la capacidad de reacción.

Entre los conocimientos generales que alumbró esta época, ya muy alejada, se encuentran, en primer plano, por una parte, la extraordinaria diversidad de los medios de que se sirven las células vivas (o las generaciones de células que se suceden rápidamente) para protegerse contra sustancias químicas nocivas que existan en el medio que las rodea y nutre y, por otra parte, la observación de que la elevación de la resistencia puede implicar alteraciones de funciones biológicas que no pueden ponerse en relación inmediata con la defensa frente a los venenos, y que por ello, en un principio, sólo se consideraron como indicadores de profundas desviaciones de procesos que presiden la vida y el crecimiento de los microbios y que se producen en el interior de las células.

En ambos respectos, los trabajos de J. EFFRONT marcaron direcciones importantes. Este autor [J. EFFRONT (1893)] señaló que las levaduras pueden habituarse a concentraciones de ácido fluorhídrico o de fluoruro amónico que, sin la habituación previa, inhibirían completamente su crecimiento y capacidad fermentativa, y E. SOREL (1894) consiguió elevar la tolerancia por encima del grado conseguido por EFFRONT. Como posteriormente demostró EFFRONT (1), la levadura, durante el proceso de acomodación, adquiere la capacidad de almacenar cal y, con su ayuda, transformar el fluoruro soluble que penetre en la célula en fluoruro cálcico insoluble y, por consiguiente, inocuo. La levadura habituada al fluor se multiplica más débilmente que la levadura de partida, pero posee una capacidad de fermentación exaltada al décuplo; resulta más sensible frente al ácido láctico, ya que su crecimiento se impide por concentraciones de este ácido, que son inoperantes para la levadura normal. EFFRONT pudo también conseguir la habituación al ácido fluorhídrico de otra levadura (del *Mycoderma aceti*); en este caso, sin embargo, la habituación al ácido clorhídrico tuvo como consecuencia una transformación más intensa de las funciones enzimáticas que la observada en las levaduras productoras del alcohol habituadas al fluor; ya que con la progresiva habituación se redujo fuertemente el rendimiento en ácido acético y se formó tanta más cantidad de agua y de CO_2 .

En 1902 T. PULST publicó sus investigaciones acerca de la capacidad de resistencia de los mohos contra venenos metálicos, principalmente contra los sulfatos de níquel y cobre, y acerca de la posibilidad de exaltar la resistencia inicial. La tolerancia natural difiere para las diversas especies de mohos, pero varía también considerablemente para las diferentes estirpes de la misma especie; por ejemplo, para las distintas razas de *Penicillium glaucum* varía entre el 1-3 y el 21 por 100 de CuSO_4 . Con el *Penicillium glaucum* y sulfato de níquel se consiguieron adaptaciones a concentraciones elevadas (hasta diez veces superiores las concentraciones que inicialmente inhibían su desarrollo). PULST considera que la causa de la resistencia natural del *Penicillium glaucum* al CuSO_4 debe ser la relativa impermeabilidad de la membrana celular para esta sal, y opina, en consecuencia, que la habituación a concentraciones más elevadas tal vez se deba a la exaltación paulatina de esta propiedad hasta alcanzar una impermeabilidad absoluta. Si esta explicación fuera correcta, pudieran predecirse que este tipo de adaptación a una sal metálica habría de

(1) Citado por LAFAR, *Handb. red techn. Mykologie*, 5, 503 (1906).

tener también como consecuencia un aumento de la resistencia a otros venenos metálicos semejantes, lo que sucede efectivamente (con una sola excepción).

b) *La pluralidad de sustancias contra las cuales puede exaltarse la tolerancia. Habitación de distintos protistas al mismo veneno.*

Ya en el periodo de las primeras investigaciones en este campo se observaron algunos fenómenos importantes que, aunque en un principio se consideraron como comprensibles por sí mismos, poseen importancia fundamental para entender el concepto de "habitación a venenos": la multiplicidad y diversidad química de las sustancias a las que puede adaptarse un protista determinado, el hecho de que protistas muy distintos puedan habituarse a la misma sustancia y, en tercer lugar, las diferencias del grado a que puede llegar la resistencia elevada al máximo. Por ejemplo, se demostró que es posible elevar la resistencia de la levadura frente a los ácidos clorhídrico y sulfuroso [F. ROTHENBACH (1896)], el formaldehído [F. ROTHENBACH (1896), J. EFFRONT (1899)], las sales de cobre [G. JACQUEMIN (1905)], las concentraciones altas de alcohol [LAURENT], el elevado contenido de sal común [J. EFFRONT (1900)], y, por otra parte, J. EFFRONT observó que no sólo la levadura, sino también las bacterias lácticas y butíricas se pueden adaptar hasta un cierto grado al ácido fluorhídrico. Estos y otros muchos resultados experimentales señalan que la transformación de sustancias solubles en insolubles y el aislamiento de las porciones sensibles de la célula a la invasión de sustancias citotóxicas no puede ser el único mecanismo al que se deba la elevación observada de la resistencia. Es cierto que podrían encontrarse, por una parte, argumentos hipotéticos, pero también pruebas experimentales convincentes de que ambos procesos juegan un importante papel. Por ejemplo, J. EFFRONT (1920) atribuyó la resistencia inducida de la levadura de cerveza frente al arsénico y al formol, a la producción exaltada de H_2S , es decir, al aumento de la capacidad de desintoxicar los grupos aldehído por oxidación. Pero, por otra parte, el principio del aislamiento encontró un firme apoyo en el análisis de la resistencia a los medicamentos.

2. ELEVACIÓN DE LA RESISTENCIA "IN VIVO". LOS TRABAJOS DE N. VON JANCÓS.

P. EHRLICH, en 1907, comunicó que el *Trypanosoma brucei* desaparece de la sangre de ratones infectados cuando los animales se tratan con fuchina; sin embargo, al cabo de una o dos semanas reaparecen los tripanosomas en la sangre, si bien pueden eliminarse de la circulación por un nuevo tratamiento con fuchina; pero si se repite algunas veces este tratamiento con fuchina, termina por perder su efecto, porque los tripanosomas se han hecho resistentes a la fuchina en el organismo infectado. Pronto se demostró que los tripanosomas pueden hacerse también resistentes *in vivo* contra otras sustancias tóxicas, en especial frente a combinaciones con arsénico.

Mucho después del descubrimiento de EHRLICH, N. VON JANCÓS (1931, 1932) pudo demostrar que la acción tripanicida de diversas sustancias de las series de la acridina, estirilquinolina y pironina se debe a que estas sustancias penetran en el protoplasma de los tripanosomas y se almacenan en él; los tripanosomas resistentes a los medicamentos, por el contrario, no captan los productos quimioterápicos o lo hacen en cantidad muy escasa, y, en opinión de JANCÓS, esta "impermeabilidad del plasma del parásito, adquirida y fijada por herencia", es la causa de su comportamiento refractario. JANCÓS no explicó cómo se produce ni en qué consiste esta alteración del protoplasma. Pero se tiene la impresión de que se trata de un proceso físico, en favor de lo cual también habla lo relativamente escaso de la especificidad de la resistencia; ya que las estirpes resistentes a la tripaflavina también lo son contra los arsenicales, y las estirpes resistentes a la estirilquinolina resisten también la acción de la arsacetina [C. H. BROWNING, J. B. COHEN, S. ELLINGWORTH y R. GULBRANSON (1929)]; consúltese la falta de especificidad de la resistencia de los mohos contra los venenos metálicos y la explicación de este fenómeno dada en la página 62.

N. V. JANCÓS (1932) aprovechó la circunstancia de que los remedios quimioterápicos de las series de la acridina, estirilquinolina y tironina poseen fluorescencia para comprobar ópticamente los resultados obtenidos con otros métodos. Observó que los tripanosomas contenidos en la sangre de ratones o ratas infectados suelen ser invisibles en el microscopio de fluorescencia; pero que, en cambio, cuando dos animales se han tratado con grandes dosis de una de tales

sustancias, los tripanosomas brillan con los colores característicos de ella. Por el contrario, los tripanosomas resistentes al medicamento continúan invisibles. De este modo pueden observarse directamente tanto la captación y almacenamiento como la barrera contra la penetración, y además se consigue establecer la localización exacta del agente quimioterápico que ha penetrado en la célula. Las combinaciones de estirilo se acumulan principalmente en el núcleo, pero también en los blefaroblastos. La acridina, por el contrario, lo hace preferentemente en los blefaroblastos (siempre en el supuesto de que se trate de tripanosomas normales y no de tripanosomas resistentes al medicamento). Esto explica el hecho anteriormente conocido de que la acridina puede hacer desaparecer los blefaroblastos que, en cambio, se conservan en tripanosomas resistentes al arsénico, porque no pueden ser alcanzados por el quimioterápico. Con razón N. v. JANCÓS vió la importancia de sus resultados experimentales en que facilitaban una interpretación concreta de la resistencia a los medicamentos, conocida desde decenios, pero que seguía sin explicación satisfactoria. Continúa sin respuesta la importante cuestión de cómo se produce la alteración, en virtud de lo cual las sustancias perjudiciales dejan de ser captadas por los tripanosomas.

3. OTRAS HIPÓTESIS QUE INTENTAN EXPLICAR LA ELEVACIÓN DE LA RESISTENCIA "IN VITRO" E "IN VIVO" POR PROCESOS PRODUCIDOS EN LAS CÉLULAS DE LAS POBLACIONES DE PROTISTAS.

a) *Desaparición de la afinidad de los receptores de las células.*

P. EHRLICH opina que los receptores de las células que permiten la captación de los agentes quimioterápicos por los tripanosomas normales, en el curso del desarrollo de la resistencia al medicamento, pueden perder total o parcialmente su afinidad específica con las sustancias que actúan como agentes quimioterápicos. Pero como los tripanosomas se habitúan a los venenos más diversos—es decir, pueden hacerse resistentes a ellos—, sería necesario admitir que en las células existe un número extraordinariamente elevado de receptores específicos (o semiespecíficos); distintos entre sí, lo que R. DUBOS (1945, página 320) y otros autores consideran improbable.

27	28	29	30	31	32
33	34	35	36	37	38
39	40	41	42	43	44
45	46	47	48	49	50

b) *Modificaciones de la actividad fermentativa.*

En otro lugar se mencionaron las observaciones de J. EFFRONT, según las cuales la elevación de la resistencia de las levaduras contra el fluor y el fluoruro amónico va acompañada de *cambios de la actividad fermentativa*. La relación entre la elevación de la resistencia y la modificación de las funciones fermentativas no resultó evidente en este caso. Pero se manifestó claramente cuando se intentó adaptar protistas a nuevas fuentes nutritivas, para lo que puede aducirse un ejemplo instructivo tomado de la obra de C. N. HINSELWODD (obra citada, pág. 172).

D. S. DAVIES intentó adaptar lo mejor posible el *Bact. lactis aerogenes* a la fuente de carbono que se le ofrecía, por continuado cultivo en diversos medios nutritivos, cada uno de los cuales contenía uno o dos hidratos de carbono determinados. Finalmente se compararon las velocidades de crecimiento (tomando como referencia la velocidad de crecimiento en glucosa, que se consideró = 100) y las actividades de dehidrogenasa (igualmente referida a la actividad de dehidrogenasa en glucosa = 100). Los resultados se ofrecen en las tablas 1 y 2.

Como muestran las tablas, la velocidad de crecimiento máxima coincide con el óptimo de actividad de la dehidrogenasa, y esta concordancia apareció en todos los experimentos en los que se cultivaron las variantes habituadas, en los medios que contienen el hidrato de carbono al que estaban adaptadas. Sólo se observó una fuerte desviación de esta ley en la elevada actividad de la dehidrogenasa para la maltosa, que no se limita a células entrenadas a vivir en maltosa; pero en este caso no se observa la coincidencia precisa entre actividad de dehidrogenasa y velocidad de crecimiento, ya que el crecimiento en maltosa no se produce, en cambio, con la velocidad máxima (consúltense las cifras de la tercera columna de las tablas 1 y 2).

TABLA 1

<i>Estirpes adaptadas a:</i>	<i>Velocidad de crecimiento relativa en (Glucosa = 100.)</i>			
	<i>Glucosa.</i>	<i>Lactosa.</i>	<i>Maltosa.</i>	<i>Sacarosa.</i>
Glucosa.....	100	33	30	53
Glucosa y lactosa.....	100	100	39	72
Glucosa y maltosa.....	88	43	103	79
Glucosa y sacarosa.....	100	34	30	100

TABLA 2

Estirpes adaptadas a:	Actividad relativa de dehidrogenasa contra (Glucosa = 100.)				
	Glucosa.	Lactosa.	Maltosa.	Sacarosa.	Glicerina.
Glucosa.....	100	—	131	47	—
Glucosa y lactosa.....	100	113	128	113	15
Glucosa y maltosa.....	100	0	115	44	27
Glucosa y sacarosa ...	100	7	100	106	—
Glucosa y glicerina ...	100	15	—	—	100

Estas alteraciones, específicas hasta un cierto grado, de la actividad fermentativa que acompañan a las adaptaciones a un nuevo principio nutritivo resultan en principio fácilmente comprensibles, y la desviación de la actividad de dehidrogenasa observada en el ejemplo aducido corresponde a lo que era de prever biológicamente que sucediera al ofrecer a la bacteria una fuente de carbono no utilizada hasta entonces por ella. En las adaptaciones a sustancias inhibitoras del crecimiento o microbicidas se han observado con frecuencia modificaciones de las funciones enzimáticas; pero, como se ha dicho, no siempre resulta manifiesta la conexión con la resistencia observada. Además, ya en el siglo pasado se publicaron observaciones de las que se deduce que las sustancias inhibitoras del crecimiento, como ácido fórmico o formaldehído, después de una acomodación suficientemente prolongada, terminan por actuar estimulando el crecimiento, de modo que las sustancias citadas son desdobladas y utilizadas como alimento [J. EFFRONT (1899), A. PÉRÉ (1896), C. NÄGELI (1881), E. DUCLAUX (1892)], lo que sería inconcebible sin la transformación del sistema fermentativo original regulador del crecimiento de los microbios. Posteriormente, S. M. NEUSCHLOSS (1919) observó que los paramaecios pueden volverse resistentes frente a la quinina, y consideró que la causa más probable de esta elevación de la resistencia es que los paramaecios adquieren la capacidad de destruir la quinina por fermentos demoledores, capacidad de que carecían inicialmente. También se exalta muy considerablemente la resistencia de la paramaecios a colorantes venenosos de las series de la tiacina, bencidina y trifetilmetano (en especial frente al azul de metileno, al azul tripán y a la fuchina), fenómeno en el que juega un papel la transformación, pro-

bablemente por vía enzimática, de los colorantes en leucoderivados innocuos [NEUSCHLOSS (1920)].

Modernamente se han determinado los fermentos como tales y medido sus alteraciones cuantitativas. De este modo C. M. MAC LEOD (1939) observó que en las estirpes de neumococos resistentes a la sulfapiridina están muy debilitadas las actividades de peróxido y de dehidrogenasa. R. A. KINNEY y R. R. MELLON (1941) observaron que en los neumococos bajo la influencia de sulfonamidas se desarrollan nuevos procesos metabólicos, en los que se produce peróxido de hidrógeno, fermentan la inulina y muestran distinto grado de infecciosidad.

Dentro del marco de esta dirección de la investigación debe incluirse también la denominada "hipótesis de la suplantación", que intenta atribuir a un mecanismo común todas las elevaciones de la resistencia de las bacterias frente a las sulfonamidas. Desde las investigaciones de D. D. WOODS (1940), WOODS y FILDES (1940), S. D. RUBBO, J. M. GILLESPIE (1940) y otros, ocupa el foco del interés el hecho de que la acción de las sulfonamidas se pueda influir de modo antagónico por el ácido p-aminobenzoico, y el pensamiento de que la elevación inducida de la resistencia de las bacterias contra sulfonamidas pudiera deberse a una superproducción del citado aminoácido, lo que parece constituir una solución inmediata y sencilla. De hecho, esta superproducción ha podido demostrarse en algunos casos, por ejemplo en las estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes al sulfotiazol [M. LANDY, N. W. LARKUM, E. J. OSWALD y F. SREIGHTOFF (1943), R. D. HOUSWRIGHT y S. A. KOSER (1944)]; sin embargo, en otras bacterias (*Shigella paradysenteriae*) no se observa este fenómeno [HOUSWRIGHT y KOSER (1944) e incluso se observan diferencias entre las distintas estirpes de la misma especie bacteriana o en una misma estirpe de *Bact. coli*, en el sentido de que la habituación a bajas concentraciones de sulfotiazol no tiene como consecuencia un aumento apreciable en la producción de ácido p-aminobenzoico, y sí la tiene, en cambio, la habituación a concentraciones altas [R. LEMBERG, D. TANDY y N. E. GOLDSWORTHY (1946)]. No pueden sorprendernos las numerosas contradicciones entre los resultados obtenidos. La suposición de que la elevación de la resistencia habría de implicar y estar condicionada por una superproducción de ácido p-aminobenzoico, procede de la "hipótesis de la suplantación" ("inhibición por concurrencia") de D. D. WOODS (1940), que admite que la utilización del ácido p-aminobenzoico en el metabolismo de las bacterias se produce mediante una reacción fermentativa; según

WOODS, esta reacción se destruye por la sulfanilamida, que suplanta al ácido p-aminobenzoico por su semejanza química con éste, sin reemplazarlo funcionalmente. Además, la hipótesis de la suplantación ofrece una aventurada analogía con el fenómeno (observado por primera vez por V. GEGENBAUER (1922) y descubierto y analizado por P. FILDES (1940/41) sin conocimiento de su predecesor), consistente en que los estafilococos que han perdido por la acción del sublimado la capacidad de multiplicarse *in vitro* e *in vivo*, vuelven a recuperar sus funciones vitales por efecto del grupo sulfhidrilo. P. FILDES opina que la inactivación por sublimado es debida a la combinación del mercurio con grupos SH de la célula bacteriana, y que de este modo la célula se ve privada de ciertas sustancias indispensables para su metabolismo; sin embargo, FILDES no ha podido explicar satisfactoriamente por qué la acción inhibitoria del Hg es reversible, ni por qué la pérdida de la capacidad de multiplicarse puede recuperarse precisamente por aquellos grupos sulfhidrilo cuya fijación por Hg, según la hipótesis, debe causar la inactivación [R. DOERR (1944, página 283)]. La hipótesis de la suplantación, fundada en supuestos previos tan inseguros, por su insuficiencia teórica, sufrió, naturalmente, ataques desde diversos ángulos, y además se obtuvieron resultados experimentales que ponen en tela de juicio su validez general: sirva de ejemplo el descubrimiento de una sulfanilamida (4-aminometilbencilsulfonamida = Homosulfanilamida o Marfanil), que no se deja influir por el ácido p-aminobenzoico [E. A. BLISS y H. C. DEITZ (1944)] y la demostración de que la acción bacteriostática de la sulfanilamida no sólo se inhibe por el ácido p-aminobenzoico, sino por otras sustancias, como metionina o urea [H. J. KOHN (1943) y otros autores]. Incluso si el antagonismo entre las sulfonamidas y el ácido p-aminobenzoico quisiera considerarse como un punto de partida muy prometedor para plantear nuevas cuestiones, no cabría deducir la conclusión de que la elevación de la resistencia frente a las sulfonamidas se deba a una superproducción de ácido p-aminobenzoico. Así, TH. LINK (1943) pretende haber observado que las estirpes de estafilococos cuando se cultivan en medios que contienen sulfonamidas adquieren la capacidad de demolerlas mediante un enzima especial que actúa directamente sobre estos quimioterápicos, de modo que éstos transforman su acción bacteriostática en la opuesta; LINK interpreta el proceso como una transformación del grupo sulfonamida en grupo de carbonilo, mediante la cual el producto adquiere las propiedades del ácido p-aminobenzoico, que es un metabolito de los estafilococos. Como se ve, en la base se encuentra la concepción,

deducida de antiguas observaciones, de que sustancias inhibidoras del crecimiento después de una acomodación suficientemente prolongada pueden llegar a utilizarse como sustancias nutritivas (véase página 67).

En el caso de la relación de antagonismo entre sulfanilamidas y ácido p-aminobenzoico, la solución hipotética del problema se facilita, en principio, por el hecho de que las dos sustancias que actúan de modo contrapuesto están definidas químicamente. La imposibilidad de establecer, incluso en este caso, una teoría que explique todos los puntos se debe a que no se conoce, o al menos no se conoce con exactitud, el sistema fermentativo sobre el que actúan las sulfanilamidas y el ácido p-aminobenzoico [H. v. EULER (1942, pág. 1878); W. B. WOOD y R. AUSTRIAN (1942)].

En general, es necesario contentarse con observar simplemente las alteraciones que se descubren en el comportamiento fermentativo de los microbios hechos resistentes, alteraciones cuya importancia para la exaltación de la resistencia, aunque no resulte directamente, puede adquirir valor en cuanto a la teoría del conocimiento por observaciones de otro tipo efectuadas en el mismo objeto experimental. Los siguientes ejemplos nos enseñan cómo debe entenderse lo anterior.

Si el *Bact. lactis aerogenes* se cultiva largo tiempo en presencia de sulfonamida, se vuelve resistente frente a este quimioterápico, y conserva esta propiedad incluso si después se cultiva largo tiempo en medio exento de sulfonamida. Durante el período de desarrollo de la resistencia se exalta la actividad de catalasa de las células bacterianas. Ahora bien, la resistencia a la sulfonamida que posee una estirpe adaptada de modo estable puede desaparecer si se la cultiva en presencia de 2,8-diaminoacridina (Proflavina); sin embargo, este efecto exige que la estirpe escogida para el experimento no haya sido adaptada previamente a la Proflavina. Pero el cultivo en medio con Proflavina reduce la actividad de catalasa tanto de estirpes normales como adaptadas a sulfonamida [C. N. HINSHELWOOD (1946, páginas 124 y 159)]. El hecho de que la Proflavina, sustancia que influye sobre la función de catalasa de las células en sentido opuesto que la sulfonamida, sea capaz de suprimir la elevación de la resistencia contra la sulfonamida cuando la estirpe resistente se multiplica en presencia de Proflavina, significa que la elevación de la resistencia y su pérdida son procesos que se basan en la cinética enzimática de las células.

Otro ejemplo nos lo ofrece el comportamiento de determinados

enzimas del *Bact. coli* cuando se cultiva en medios cuyo pH difiere del valor óptimo. En tanto que no se produzca ninguna adaptación, se mantienen inalterados tanto el óptimo como los límites de tolerancia. Pero un cierto grupo de enzimas, al que pertenecen la ureasa y la catalasa, aumentan en cantidad cuando el pH en que se cultiva el *Bact. coli* se aleja del óptimo, y así se compensa la reducción de su actividad por el pH desfavorable [E. F. GALE y H. M. EPPS. (1942)]. Como el aumento de la cantidad de fermentos provocado por el pH desfavorable no remite en cuanto se vuelve a cultivar las bacterias coli en su pH óptimo, se llega al resultado aparentemente paradójico de que al pH óptimo tal estirpe forma más fermento que otra sin historia previa, es decir, sin previo cultivo en pH desfavorable. C. N. HINSHELWOOD (1946, pág. 159) considera especialmente importante el hecho de que se eleve la cantidad de enzima producida por cada célula hasta restablecer en cierta medida la actividad enzimática, a pesar del pH desfavorable, porque aporta una interesante prueba de los procesos de adaptación de la cinética enzimática en el conjunto de células de una población bacteriana.

c) Selección de mutantes.

Todas las hipótesis, hasta aquí expuestas, acerca del mecanismo de exaltación de la resistencia de protistas frente a sustancias tóxicas, admiten que debe tratarse de alteraciones que se producen en el conjunto de células de la población de protistas en crecimiento. Esto puede decirse tanto de la transformación de las sustancias tóxicas en derivados inócuos, como de la creación de barreras que impidan la penetración de los venenos hasta los puntos vulnerables, de la desaparición de receptores en la teoría de EHRlich, y de la idea de que sufran transformaciones cuantitativas o cualitativas los sistemas enzimáticos que participan de modo esencial en el crecimiento y multiplicación de los protistas. En oposición fundamental con esta idea rectora existe la doctrina de que las células particulares de las poblaciones de protistas no participan, en resumidas cuentas, en la elevación de la resistencia, sino que ésta se debe a mutantes preexistentes o producidas durante el experimento; es decir, a pocos ejemplares que ya poseían una resistencia elevada y que, al cultivar los protistas en presencia de sustancias tóxicas, por selección natural van adquiriendo el predominio numérico sobre las variantes no resistentes hasta excluirlas totalmente de las poblaciones. En otro lugar nos ocuparemos de esta teoría que intenta explicar todos los experimentos de habituación (no

sólo los de habituación a sustancias tóxicas) por un juego recíproco de mutaciones y selección, y donde esto no alcance, por mutaciones regresivas.

d) *La investigación del proceso como principio heurístico.*

En lugar de partir de una hipótesis cualquiera, que pueda valer como principio heurístico, es posible, y resulta indudablemente más objetivo, seguir simplemente el *proceso de la elevación de la resistencia contra sustancias microbicidas o inhibitoras del desarrollo*, con la esperanza de observar, mediante tales investigaciones, algunas leyes ricas en conclusiones. Para descubrir tales leyes deben utilizarse métodos cuantitativos.

C. N. HINSHELWOOD (obra citada, págs. 109 y siguiente) esbozó el camino para agotar las posibilidades que reserve este procedimiento al operar con cultivos bacterianos. Como estas normas de trabajo poseen importancia general y utilizan expresiones técnicas con las que tal vez no esté habituado cualquier lector, las reproduciremos en este lugar.

Para la investigación cuantitativa, según HINSHELWOOD, hay que determinar, primero, la inhibición inicial del crecimiento (en inglés, "lag", que se designa, abreviadamente, por L); segundo, la duración media de cada generación, y, tercero, el número total de bacterias en el momento del máximo crecimiento, todo ello como funciones de un número de subcultivos sucesivos (pases por medios de cultivo) en presencia de una determinada concentración de la sustancia inhibitora del crecimiento. En la figura 1.^a se da un ejemplo de una de tales medidas, que consiste en determinar el número de bacterias existentes por mililitro de medio de cultivo a intervalos regulares. En lugar de los números encontrados se toman en ordenadas los logaritmos de los mismos, representación que expresa del modo más sencillo la duración media de cada generación; es decir, el tiempo que tarda en duplicarse el número de bacterias. La parte del diagrama comprendida entre B y C se denomina fase del crecimiento logarítmico. Antes de ella transcurre un periodo (trozo AB) durante el cual las bacterias se multiplican poco; en todo caso, ni con mucho, con la intensidad de la fase del crecimiento logarítmico; este periodo es el de la inhibición inicial del crecimiento ($lag = L$).

Ahora bien, si al medio de cultivo en el que se siembra la estirpe bacteriana se añade una sustancia inhibitora del crecimiento en una concentración no demasiado elevada, por ejemplo, si a una estirpe de

Bact. lactis aerogenes adaptada a un medio sintético se le añade 43 mg. de 2,8-diaminoacridina (Proflavina) por litro de medio de cultivo, se producen las siguientes alteraciones, que pueden observarse y medirse con facilidad: 1. La duración media de una generación aumenta en la fase logarítmica del crecimiento; pero, después

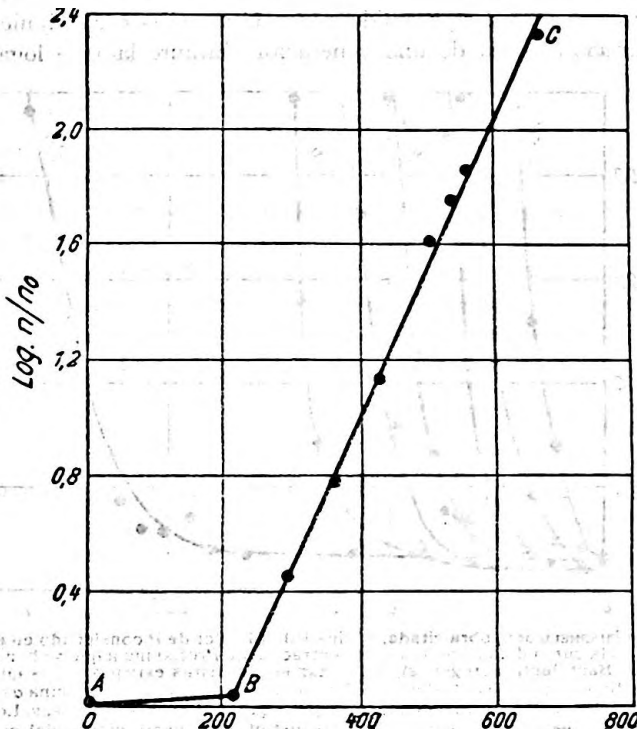


Fig. 1. Curva de crecimiento de una estirpe de *Bact. coli mutabili* que se adoptó, en lo posible, por gran número de subcultivos (pases en el medio) a un medio sintético compuesto de sulfato, amoníaco, lactosa y sales (según HINSHELWOOD, obra citada, página 38); n_0 significa el número de bacterias al comenzar el experimento, prácticamente igual al número de bacterias con que se siembra el medio de cultivo.

de un cierto número de pases en el medio con Proflavina, vuelve a los valores normales. 2. En el primer subcultivo en el medio con Proflavina, con frecuencia aparecen células largas filamentosas que indican que la partición celular está inhibida; en los pases siguientes no vuelve a verse esta formación de hebras. 3. Se reduce el número total de las bacterias (el número de células bacterianas de que consta la población bacteriana); incluso cuando las células estén totalmente

adaptadas a la Proflavina en todos los otros aspectos, la población continúa numéricamente débil en comparación con la normal y frente a esta acción parcial no se logra ninguna "inmunidad"; y 4. La fase inicial de inhibición del crecimiento (L) se prolonga mucho, pero después de una serie de pases en un medio que contenga la misma cantidad de Proflavina, vuelve al valor normal. La adaptación a la Proflavina que se ha conseguido se manifiesta, por consiguiente, en que la duración media de una generación durante la fase logarítmica

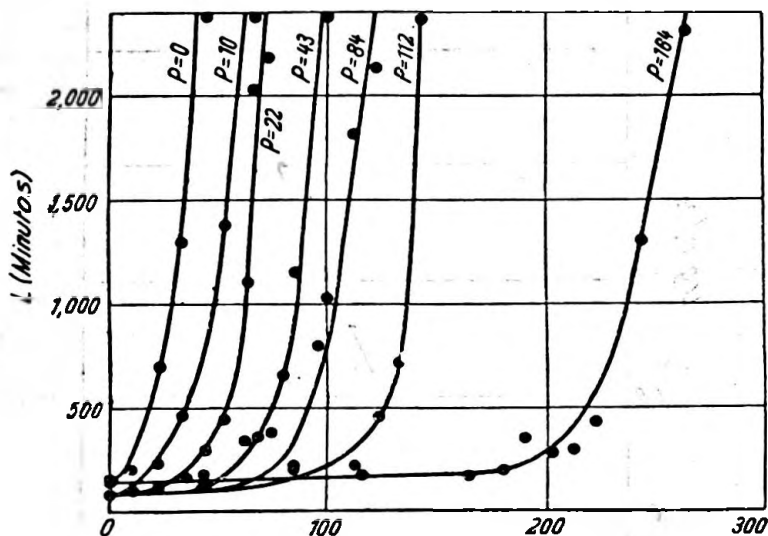


Fig. 2 (según HINSHELWOOD, obra citada, página 139). El valor de P consignado en el extremo superior de cada curva da, en mg./l., la concentración de Proflavina a que se han habituado las bacterias (*Bact. lactia aerogenes*); se utilizan seis de estas estirpes, a las que hay que añadir un testigo en que P es igual a cero. En estas siete estirpes se determina α en minutos para las concentraciones de Proflavina, en mg./l., que se llevan en abscisa. Los círculos rellenos de negro marcan la α mínima para las distintas concentraciones del ensayo y las curvas enlazan los distintos valores de α obtenidos para los testigos y para cada una de las seis variantes obtenidas por adaptación a distintas concentraciones de Proflavina.

del crecimiento y la inhibición inicial del crecimiento (L) se comportan como si el medio no contuviera Proflavina.

Cuando las bacterias se adaptan lo más posible a una concentración determinada de la sustancia inhibidora (concentración = x), se pueden conseguir nuevas aclaraciones si se examina el comportamiento de esta estirpe frente a una serie de concentraciones menores que x , especialmente al determinar el valor mínimo de la inhibición inicial de crecimiento (L). Si se procede de modo análogo con variantes de la misma estirpe adaptados a otras concentraciones de la sustancia

inhibidora, con otras palabras, variando x , se obtiene, al representar gráficamente los resultados, una serie de curvas que ponen de manifiesto, por una parte, las relaciones entre la inhibición de crecimiento y las concentraciones de las sustancias inhibitoras, y, por la otra, la dependencia de estas relaciones con la concentración, a las que se adaptó previamente la estirpe (véase figura 2.^a).

Una vez que, del modo descrito, se ha conseguido la adaptación, y analizado el proceso, hay que investigar en qué grado es reversible la elevación de la resistencia. Para ello se sigue cultivando la estirpe adaptada por pases en el medio de cultivo, pero en ausencia de la sustancia inhibitora, y se investiga de vez en cuando su comportamiento frente a distintas concentraciones de ésta. Si de este modo no se consigue la vuelta al estado normal, puede aplicarse otro método. Por ejemplo, el cultivo en presencia de otras sustancias antibacterianas o en medios de cultivo de otra composición. Finalmente, puede ser objeto de investigación la especificidad de la elevación de la resistencia. Las estirpes bacterianas que resultan resistentes frente a unas determinadas sustancias, pueden ofrecer una tolerancia superior a la normal ante otras.

4. HIPERSENSIBILIDAD COMO FASE PREVIA A LA ELEVACIÓN DE LA RESISTENCIA.

Antes de investigar más exactamente el mecanismo de la habituación de los protistas a sustancias inhibitoras del crecimiento, mencionemos que ya los investigadores que fueron los primeros en explorar este campo observaron que algunos experimentos planeados para provocar una elevación de la resistencia a un veneno tenían la consecuencia contraria, es decir, la exaltación de la sensibilidad. DAVENPORT y NEAL (1896), por ejemplo, consiguieron volver resistentes a protozoos contra el sublimado y la quinina; pero comprobaron, sin embargo, que las disoluciones demasiado concentradas aumentaban su sensibilidad. C. MEISSNER (1903) hizo una observación análoga al cultivar el *Mucor stolonifer* en medio que contiene fenol. En 1924 reprodujo A. SCHNABEL estas antiguas observaciones y publicó experimentos [SCHNABEL y KASARNOVSKY (1924)] según los cuales la tripaflavina vuelve más sensibles para ella a los estreptococos. Otros autores [CH. RICHET, BACHRACH y CARDOT (1921), E. BACHRACH y CARDOT (1922), F. ARLOING y THÉVENOT (1922), C. W. JUNGEBLUT (1923), E. BARACH (1926)] se ocuparon del mismo tema y llegaron

a la conclusión de que distintos microorganismos, cuando se multiplican bajo la influencia de sustancias perniciosas para los gérmenes (nitrato de talio, sublimado, fenol, optoquina, quinina, nitrato de plata, tripaflavina y otras), pueden adquirir hasta un cierto grado de hipersensibilidad específica contra la sustancia utilizada. Como medida más sencilla de la sensibilidad se utilizó la mínima concentración de veneno que aun resulta activa. Los tipos de las acciones tóxicas que se examinaron experimentalmente diferían, sin embargo, mucho entre sí, y, además, tan pronto se referían a la intensidad de la formación de pigmento como a la inhibición del crecimiento, a la movilidad de los microbios o a funciones fermentativas (reductasas, carbohidrasas, etc.). Esta falta de homogeneidad de los indicadores de la perturbación microbiana, así como planteamientos erróneos de los experimentos y el empleo de insuficientes testigos, dificulta el exacto enjuiciamiento de los resultados; y a este estado de cosas también contribuye la tendencia propagandística a comprender, en la literatura, el fenómeno de la hipersensibilidad de los microbios bajo el concepto de "anafilaxia" a la sazón en primer plano del interés científico [F. ARLOING y THÉVENOT, RICHET, BACHRACH y CARDOT, BACHRACH y otros].

Sin embargo, bajo la designación de "anafilaxia" se entiende un modo de reaccionar modificado de modo *cualitativo*, en tanto que en la hipersensibilidad de los microbios, según los datos que se tienen a la vista, parece tratarse simplemente de una elevación puramente cuantitativa de la reactividad normal. Como fenómeno único homólogo de la hipersensibilidad de los microbios parece que sólo se ofrece a nuestra consideración la hipersensibilidad frente a las toxinas descrita por primera vez por E. v. BEHRING, que además también se asemeja a aquél en las condiciones en que se produce. En efecto, SCHNABEL y SCHNABEL y KASARNOWSKY observan que las concentraciones de veneno bajas resultan especialmente apropiadas para elevar la sensibilidad de los microbios; y análogamente se ha observado que la hipersensibilidad de los animales frente a la toxina, aun cuando todo el proceso de inmunización activa antitóxica se efectúe mediante toxinas nativas, se hace sentir de modo especial en las primeras fases de la producción de sueros antitóxicos, y por ello resulta necesario comenzar con dosis muy pequeñas, que luego se elevan de modo paulatino.

Justamente por esta relación con la hipersensibilidad frente a las toxinas, sería importante saber si es correcta la afirmación de que la elevación de la resistencia va precedida de una fase de hipersensibi-

lización, o si ésta es la única alteración del modo normal de reaccionar que puede apreciarse en ciertas sustancias nocivas para los gérmenes. La existencia de una hipersensibilidad pudiera aducirse como prueba en contra de la tesis de que todas las modificaciones del modo de reaccionar frente a sustancias microbicidas son debidas a la selección natural de tipos preexistentes. En las páginas 73 y siguiente ya se señaló que si se añade a un medio de cultivo una sustancia inhibidora del crecimiento, pueden prolongarse tanto la inhibición inicial del crecimiento, como la duración media de las generaciones, durante la fase de multiplicación logarítmica, y que no se vuelve a los valores normales hasta después de dar una serie de pases por el mismo medio. Pero estos hechos no concuerdan con los informes de la literatura antigua acerca de la hipersensibilidad de los microbios, porque las acciones designadas se desencadenan por las concentraciones más diversas y se intensifican a concentración creciente, y porque no existe ninguna prueba de que las bacterias, en el momento en que se producen los efectos, sean más sensibles que las bacterias normales. El comportamiento en los subcultivos efectuados a concentración constante, hablan más bien en contra de una hipersensibilidad, y, por ello, deben comprobarse exactamente, una vez más, los datos antiguos antes de decidir con seguridad acerca de la existencia de una hipersensibilidad de los microorganismos frente a los venenos.

5. INTERPRETACIÓN DE LA RESISTENCIA DE PROTISTAS FRENTE A LOS VENENOS.

Como dicen las expresiones "habitación" o "acomodación" a un veneno, en todos los fenómenos de este tipo se consideran manifestaciones de la capacidad de adaptación, facultad que desde antiguo se considera como uno de los criterios más esenciales de un organismo vivo. La existencia de los individuos y la de las especies depende de la posesión de esta capacidad.

Si a nosotros la consideración de la adaptación a un determinado ámbito, como estado fijo y terminado, se nos ofrece en forma de reacciones y organizaciones con frecuencia complicadas y llenas de sentido, no podemos emitir ninguna opinión segura acerca del proceso que conduce a tales estados definitivos. La investigación sobre la herencia, a pesar de muchas objeciones [J. P. LOSTY (1916, 1931), H. F. OSBORN (1927)], hace responsable del origen de las especies y de las subdivisiones de éstas, a "mutaciones" [véase TH. DOBZHAN-

SKY; *Genetics and the origin of the species* (1941)], lo que, considerado sin prejuicios, no significa sino el reconocimiento de la necesidad de atribuir carácter hereditario a las alteraciones que causan estos procesos, que en el mundo de los seres vivos, en caso contrario, no hubieran podido fijarse como tipos permanentes. Como no existe ningún otro motivo para considerar la mutación como principio evolucionista exclusivo, aparece al desnudo que la genética clásica, derivada de observaciones en organismos superiores, intenta extender sus conclusiones a los inferiores. Por ejemplo, S. E. LURIA (1947), en su revisión *Recent advances in bacterial genetics*, escribe: "Bajo la designación de mutación (el autor se refiere a la de las bacterias) entendemos toda modificación persistente que alcance a una o varias propiedades de la célula bacteriana y de su descendencia. La aplicación de este término no significa, *a priori*, una identificación con el proceso de la mutación de los genes o de cualquier otro tipo de alteraciones hereditarias en los organismos superiores." H. FRIEDRICH-FREKSA, G. MELCHERS y G. SCHRAMM (1946) intentan establecer una diferencia entre mutaciones y modificaciones persistentes (concepto al que habremos de referirnos inmediatamente); según su concepción, no basta que, a consecuencia de influencias del medio, se produzcan alteraciones que se mantengan durante varias generaciones, sino que más bien es esencial el *carácter fortuito* de la desviación. Las influencias del medio (irradiaciones, temperatura elevada) sólo pueden elevar la frecuencia de las mutaciones, la velocidad de mutación; pero no condicionar el tipo de desviación. Como FRIEDRICH-FREKSA y colaboradores en la publicación citada se ocupan de mutantes de virus fitopatógenos (virus del mosaico del tabaco), se comprueba que el concepto de mutación se aplicaría también a estas unidades con capacidad de multiplicación, sumamente primitivas, y que en este campo se identifica con la concepción de una alteración hereditaria, no inducida de modo específico y, por tanto, carente de dirección. Sin embargo, la elevación de la resistencia de los organismos unicelulares frente a determinadas sustancias inhibitoras del desarrollo, es una alteración dirigida adaptada a la sustancia inductora, y, según ello, habría que excluir, por definición misma, a la mutación como proceso causante de tales adaptaciones. Sin embargo, TH. DOBZHANSKY, en la página 52 de su obra ya citada, *Genetics and the origin of the species*, escribe: "Suponer que el organismo está dotado de la capacidad de producir mutaciones adaptativas—o lo que entendamos bajo cualquier otro nombre que pueda elegirse para designar los cambios evolucionarios elementales—y creer que estos cam-

bios se producen precisamente donde y cuando se necesitan, equivale a creer milagros." No obstante, no cabe dudar que la posibilidad de estimular considerablemente la resistencia de los protistas frente a sustancias que actúan tóxicamente sobre ellos, es un hecho firmemente establecido por una serie muy numerosa de experimentos; de modo que si se desea profundizar en el mecanismo de tales procesos hay que responder previamente a dos preguntas: 1, si en los protistas la heredabilidad y la no heredabilidad se distinguen entre sí tan claramente como en los organismos superiores, y 2, si una propiedad inducida específicamente por la alteración de las condiciones del medio puede llegar a fijarse por herencia. Por haber precedido en el tiempo a la otra comenzaremos por discutir la primera cuestión, considerando los resultados experimentales y sus distintas interpretaciones.

(a) *Las modificaciones persistentes de los protozoos.*

Para prevenirse de la heterogeneidad de las poblaciones de protozoos se suelen utilizar como objetos de experimentación "líneas puras" (colonias), es decir, poblaciones microbianas producidas por particiones asexuadas y procedentes de una única célula madre. Estos experimentos fueron emprendidos con infusorios (*Paramecium caudatum* y *Paramecium aurelia*) por H. S. JENNINGS (1908 a, b); pero en un principio sólo consiguió aislar de poblaciones heterogéneas de dichos infusorios—poblaciones procedentes de la libre naturaleza—los biotipos caracterizados por su distinta capacidad de resistencia a las transformaciones del medio, y señalar que en tales líneas puras la selección no actúa, es decir, que no se alcanza, por ejemplo, a modificar el valor medio de la curva de variación del tamaño de una de tales colonias por la selección para el cultivo de paramecios especialmente grandes o especialmente pequeños. Poco después de JENNINGS efectuó V. JOLLOS experimentos en los mismos infusorios y, coincidiendo con aquél, llegó a la conclusión de que "en una serie de 50 fases de selección no se observó nunca que por selección se consiguiera una desviación hereditaria de la norma reaccional de una colonia, el desdoblamiento de una colonia en líneas distintas desde el punto de vista hereditario". Pero JOLLOS, por la acción de distintos productos químicos, en especial de ácido arsenioso, consiguió elevaciones de la resistencia que, en una multiplicación puramente vegetativa, parecían "condicionadas hereditariamente", de modo que cuando la sustancia nociva para la célula dejaba de actuar, es decir, cuando los infusorios se sembraban en el medio original exento de veneno,

continuaba su alteración, y durante una impresionante serie de particiones celulares (hasta de varios millares), se caracterizaban por su resistencia a la última concentración de veneno que llegaron a soportar. Como este comportamiento difiere de las alteraciones que la teoría clásica de la herencia designa como modificaciones, V. JOLLOS (1913, 1921) creyó conveniente caracterizarlo, como fenómeno *sui generis*. por un término especial, y propuso el nombre de "modificaciones persistentes". Como estas modificaciones persistentes, en multiplicación puramente vegetativa en ausencia de la sustancia tóxica, suelen remitir espontáneamente, JOLLOS opinó que no podía tratarse de modificaciones del complejo de genes, y consideró como causa más probable alteraciones del plasma celular [V. JOLLOS (1921, 1934, 1939)]. La estabilidad de las modificaciones persistentes difiere mucho de unos casos a otros. Pero, en general, se aprecia una cierta relación entre la duración del período de actuación de la sustancia que ejerce la transformación del protoplasma y la estabilidad de las alteraciones. Cuando los paramaecios se vuelven a sembrar en condiciones normales después de un prolongado sometimiento a la acción de los factores transformadores, conservan la alteración conseguida más tiempo que otros que hayan sufrido la misma influencia, pero durante un período breve. No obstante, V. JOLLOS (1921), en sus experimentos en paramaecios, no consiguió modificaciones persistentes irreversibles, por muy reiterada o persistente que fuera la actuación de los factores transformadores, pero no excluye básicamente esta posibilidad.

T. RAFFEL (1932), en oposición a V. JOLLOS, intentó atribuir a mutaciones de los genes todas las alteraciones obtenidas en paramaecios y designadas por JOLLOS "modificaciones persistentes", incluso las elevaciones de resistencia frente a sustancias citotóxicas; interpreta la desaparición de las mutaciones persistentes como mutación regresiva. Sin embargo, esto incurre en lo estigmatizado por DOBZHANSKY como credulidad en milagros (véase la cita en la página 78). Pues D. RAFFEL no sólo opinaba que los paramaecios reaccionan a la acción de sustancias tóxicas por una mutación de adaptación, sino que cuenta además con la posibilidad de que los paramaecios se despojen de la mutación adaptada, cuando les es ya superflua, mediante un proceso de mutación inverso. Señalemos, entre paréntesis, que toda modificación, tanto si ha producido espontáneamente, como si se ha inducido, puede atribuirse a una "mutación" (incluso cuando no exista ningún punto de apoyo citológico que permita aceptar la existencia de un aparato de herencia localizado en el núcleo o en cromosomas), siempre que se combinen de diversos modos los hipotéticos

elementos de mutación, mutación regresiva, selección y distintas velocidades de multiplicación de las variantes, sin aportar pruebas precisas de la cooperación cualitativa y cuantitativa de cada uno de los factores citados; de este modo se puede llegar *en cada caso* a una "explicación satisfactoria", posibilidad que nace de la naturaleza de los elementos hipotéticos.

JOLLOS considera la concepción de RAFFEL como totalmente insatisfactoria e insuficiente. W. v. SCHUCKMANN y G. PIEKARSKI, apoyándose en experimentos propios, notables en varios respectos, toman, en esta controversia, postura en contra de los puntos de vista de JENNINGS y colaboradores, a los que pertenece también RAFFEL.

SCHUCKMANN y PIEKARSKI (1940) utilizaron como objetos de investigación, primero, una estirpe de *Colpoda steini*, que no posee micronúcleo; en segundo lugar, una estirpe de la misma especie que posee un micronúcleo, y, en tercer lugar, una estirpe de *Paramecium caudatum*. Las dos estirpes de *Colpoda* se expusieron a distintas diluciones de As_2O_3 0,1 N, y, por elevación paulatina de la concentración de arsénico, se modificaron de modo que llegaron a cultivarse, en pases continuados, en medios incluso con un 40-45 por 100 de As_2O_3 0,1 N, cuando las estirpes sin entrenar sólo soportan concentraciones de un 7 a un 12 por 100. La tolerancia adquirida a concentraciones letales de As_2O_3 se conserva mucho después de haber vuelto al cultivo en medio libre de arsénico, y tanto más tiempo cuanto más se hubiere prolongado la actuación del ácido arsenioso sobre los infusorios, y *va perdiéndose siempre de modo paulatino, nunca súbitamente*, como cabría esperar en caso de una mutación regresiva. Como ambas estirpes de *Colpoda*, de las cuales sólo una poseía micronúcleo, se comportaron de igual modo en todos los respectos, no pueden atribuirse a alteraciones del micronúcleo, la aparición de la tolerancia, ni su persistencia, ni su regresión; por consiguiente, sólo quedan dos componentes de la célula donde localizar la resistencia al arsénico: el citoplasma y las porciones del macronúcleo extra-cromosómicas y no pertenecientes al genoma. Los autores se deciden por la alteración del plasma en el sentido de JOLLOS. Merece considerarse el hecho de que el intento de habituar el *Paramecium caudatum* al ácido arsenioso sólo ha dado resultados positivos de muy pequeña cuantía, a causa de la gran sensibilidad de este ciliado; en el caso más favorable los paramaecos soportan un 2,7 por 100 de As_2O_3 0,1 N.

En contra de la existencia de alteraciones de los genes localizados en los cromosomas, es decir, de mutaciones en el sentido de la teoría clásica de la herencia, hablan todos los resultados experimentales de

SCHÜCKMANN y PIEKARSKI, en especial la ausencia de toda aparición súbita de la tolerancia, la desaparición paulatina de la misma, el que la persistencia de la resistencia al arsénico dependa de la duración del periodo en que se hizo actuar el arsénico, y la circunstancia de que la tolerancia al arsénico desaparezca más rápidamente en un medio exento de arsénico que cuando se continúan cultivando las estirpes de Colpodas en medios con escaso contenido de arsénico. Aun se podría añadir que la consideración de mutaciones como causa de la exaltación de la resistencia contradice la definición de la mutación como una alteración del genoma inducida de modo no específico. También debe rechazarse que la única causa de la habituación de los organismos unicelulares a los venenos sea la selección de tipos pre-existentes. Con razón HINSHELWOOD (obra citada, pág. 208) dice que, si se consideran los descubrimientos experimentales conseguidos, había que admitir la preexistencia de un enorme número de tipos; y como el número y diversidad de estos tipos seguiría aumentando con cada nuevo resultado positivo de una prueba de adaptación a una sustancia cualquiera hasta ahora no ensayada, se alcanzarían pronto límites que equivaldrían a una reducción al absurdo.

b) *La existencia de alteraciones fijadas por la herencia inducidas de modo específico.*

Un ejemplo de este tipo de alteraciones inducidas, casi completamente explicado y que puede reproducirse en toda momento, es la *capacidad de transformación de los tipos de neumococos*, proceso que posee una cierta semejanza con la habituación de los organismos unicelulares a sustancias perniciosas para ellos, ya que se conoce, es decir, está definido químicamente, el factor inductor (el transformador). Según las investigaciones de O. T. AVERY, C. M. MAC LEOD y M. McCARTY (1944), los ácidos desoxi-ribonucleínicos, específicos de tipo, incluso a concentraciones extraordinariamente bajas (1:600 000 000), son la causa de la transformación de la variante R de un tipo X de neumococo en una variante capsulada S del tipo Y, tipo del que procede el ácido desoxi-ribonucleico transformador. Pueden verse más detalles en la exposición de conjunto de R. DOERR (1948, págs. 81 y siguiente y págs. 109 y siguiente). La transformación de los tipos es un proceso súbito, absolutamente específico y no regresivo si no se revierte la variante S transformada en una forma R descapsulada, que no es específica de tipo. La transformación considerada bioquímicamente consiste en que el tipo neo-

formado continúa produciendo el transformador, es decir, el ácido desoxi-ribonucleínico específico de tipo, al que debe su formación, en tanto que se mantengan las condiciones del medio de cultivo necesarias para la formación de cápsula. Ahora bien, porque la transformación se transmite por herencia, este fenómeno se designa como "mutación", enfrentándose, con notable ausencia de reserva, con toda la historia del desarrollo del concepto de mutación; sin embargo, ya se ha señalado (véase en pág. 78) que no existe ningún motivo que justifique la designación de "mutación" en el caso de la transformación de los tipos del neumococo.

Por el contrario, fundándonos en los hechos aducidos en los apartados A y B, podemos contestar en sentido afirmativo a las dos preguntas formuladas en la página 79 sin necesidad de recurrir a términos técnicos como mutación, modificación, etc.

1. En los protistas, que se multiplican por simple partición asexual, no pueden distinguirse netamente entre sí heredabilidad y no heredabilidad. Más bien pueden establecerse grados de fijación por herencia;

2. Ciertas alteraciones provocadas por condiciones del medio, inducidas, pueden considerarse como irreversibles, es decir, como totalmente transmisibles por herencia.

¿Cómo aplicar estos conocimientos generales y los hechos en que se fundan, a la interpretación de la resistencia de los protistas contra sustancias tóxicas?

Hay que dejar aparte, *a limine* la transformación de tipo de los neumococos. Pues la elevación de la resistencia no se produce de modo súbito, sino que habitualmente exige, para su desarrollo máximo, un largo tiempo, es decir, numerosos pases en cuyo curso se va cumpliendo la transformación paulatina desde el comportamiento normal a la total adaptación, lo que puede también apreciarse en que la inhibición inicial del crecimiento (L) vuelve a tender gradualmente al valor primero, y finalmente lo alcanza, como ha podido demostrarse, entre otros casos, con el *Bact. lactis aerogenes* y la proflavina; en el mismo ejemplo se observó también que la estabilidad de la resistencia adquirida no se mantiene al mismo nivel durante el período de desarrollo de la resistencia, sino que pasa por varios grados que pueden diferenciarse entre sí experimentalmente. Además, la elevación de la resistencia, como ya se ha señalado en otro lugar (véase página 62 y página 64), no se asemeja por el grado de especificidad a la acción de los ácidos desoxi-ribonucleínicos específicos de tipo. Por ejemplo, la exaltación de la resistencia contra una sustancia del

grupo de las sulfonamidas se extiende a todas las otras sustancias de este grupo que se han ensayado [D. S. DAVIES y C. N. HINSELWOOD (1943), W. M. KIRBY y L. A. RANTZ (1943)], la resistencia del *Bact. lactis aerogenes* inducida por la proflavina se dirige también contra otras acridinas y contra el azul de metileno, fenómeno que también se produce en la relación recíproca, ya que la resistencia adquirida frente al azul de metileno entraña una elevación de la tolerancia contra la proflavina [J. M. PRYCE, D. S. DAVIES y C. N. HINSELWOOD (1945)]. La elevación de la resistencia inducida no se fija por la herencia de un modo absoluto. Con frecuencia desaparece por cultivo prolongado en un medio exento del veneno. O. E. GRÄSSLE y B. M. FROST (1946) cultivaron una estirpe de *Staphylococcus aureus*, cuya tolerancia frente a penicilina cristalizada se había elevado en el transcurso de quince días a 60 veces el valor inicial, por pases diarios en caldo exento de penicilina, y de este modo regresó rápidamente al comportamiento inicial; al cultivar de nuevo la estirpe en medio con penicilina recuperó la resistencia. Cuando por los pases a través medios de cultivo exentos del veneno no se consigue privar a la estirpe de la resistencia adquirida, en muchos casos puede conseguirse el propósito de modo rápido y radical por medios inespecíficos (consúltese pág. 90). Por último, los ácidos desoxi-ribonucleínicos son productos del metabolismo de los neumococos, y estas sustancias, de origen endógeno, no provocan más que la transformación de un tipo en otro, pero no dan origen a nada nuevo, sino únicamente a tipos que también existen en circunstancias naturales. Por el contrario, la exaltación de la resistencia de los protistas frente a sustancias químicas hay que referirla a sustancias químicas que no preexisten en las células, y, por tanto, deben considerarse como transformaciones inducidas exógenamente que, aunque sólo sea en sentido cuantitativo, manifiestan propiedades nuevas. O. E. GRÄSSLE y B. M. FROST (1946) consiguieron exaltar la resistencia a la penicilina de las estirpes del *Staphylococcus pyogenes aureus* 1.500 veces, a lo que contribuyó tanto como la peculiaridad de la estirpe la duración de la exposición. Por tanto, las elevaciones de la resistencia están en todos los respetos en oposición estricta con la transformación de los tipos del neumococo, y por ello no es admisible, en buena crítica científica, recurrir siempre que se aventuran hipótesis acerca de procesos de herencia en bacterias, como prueba fundamental precisamente a la transformación de tipo.

El paradigma fundamental de las elevaciones de resistencia de los protistas contra sustancias nocivas, que actúen sobre ellos como agen-

tes externos lo siguen constituyendo las habituaciones descritas por V. JOLLOS, de los protozoos al arsénico y a otros agentes, afirmación que también se extiende a las bacterias, como se demuestra por extenso en el siguiente capítulo.

c) *La elevación de la resistencia de bacterias frente a sustancias tóxicas para ellas.*

S. E. LURIA (1947), en su revisión de los recientes avances en el campo de los procesos de herencia en bacterias, se refiere también a las modificaciones persistentes observadas en protozoos, y opina que, aunque su mecanismo aún no se conozca, puede considerarse probable que se trate de alteraciones sufridas por el citoplasma, que no son tan fijas como las mutaciones de los genes. LURIA cita a W. B. BRIERLEY (1929) como representante de la opinión de que las alteraciones inducidas en las bacterias por influencias del medio, que suelen ser reversibles, pudieran ser muy semejantes a las modificaciones persistentes de los protozoos. A ello hay que añadir que, como también subraya LURIA, en las bacterias no es posible distinguir entre genes y plasmagenes, porque la diferenciación de la célula bacteriana no está, en general, tan avanzada como en las células de los organismos con multiplicación sexual, que poseen un núcleo en cuyos cromosomas se localizan los genes nucleares. En los organismos superiores, la herencia plasmática, según opinión de TH. DOBZHANSKY (obra citada, pág. 93), es un fenómeno raro que sólo ha podido observarse, con seguridad, en los mohos y en el *Epilobium*; y en este caso tampoco se trata de alteraciones que aparezcan dentro de una especie, sino de bastardeamientos experimentales de distintas especies y órdenes que no se cruzan entre sí en condiciones naturales.

Como ha podido verse, las hipótesis acerca de los procesos de herencia en las bacterias se apoyan en bases totalmente inseguras (1).

(1) En una Memoria (aún en prensa) sobre "el problema del núcleo celular de las bacterias", de GERH. PIEKARSKI (*Ergebnisse der Hygiene*, tomo 26) se llega a la conclusión de que el problema de si las bacterias poseen núcleo debe contestarse indudablemente de modo afirmativo, debiendo debatirse únicamente si los núcleos de las bacterias difieren de los núcleos de las células de los organismos superiores por la separación espacial y morfológica de la cromatina y de la acromatina. Esta Memoria, que ha sido conocida por uno de nosotros (R. DOERR) en el original, no da ocasión a modificar el texto de nuestras consideraciones, ya que éstas, en muchos puntos importantes, son independientes de la existencia y de las particularidades aún no aclaradas del núcleo bacteriano.

Esto fue reconocido también, paulatinamente, por todos cuando se empezó como una zona importante y específica investigada por una gran número de autores para dar origen a las que se habían producido alteraciones hereditarias paulatinas bajo la influencia de modificaciones de las condiciones del medio. Incluso si, como considera por ejemplo Luria, tales alteraciones se debieran, la mayor parte de las veces, a "fases de mutación espontáneas, discontinuas y dirigidas en el mismo sentido" que estuvieran complicadas con períodos de selección, podría, sin embargo, suceder que apareciera un nuevo tipo de resistencia hasta ahora desconocido o, al menos, no admitido. Sin embargo, la revisión general experimental propuesta sólo podría alcanzar el fin propuesto si se tendiera a él con espíritu libre de prejuicios. Lo que apenas cabe esperar si se considera el cúmulo de trabajos experimentales dominados por la tendencia a considerar las alteraciones hereditarias o condicionadas por herencia de las bacterias al mismo nivel que los procesos hereditarios de los seres vivos sumamente diferenciados.

Muchas veces la crítica se pliega a la palabra como en una publicación de J. M. SEVERENS y F. M. TANNER (1945) cuyo contenido vamos a exponer precisamente por esta razón: Los autores citados intentaron habituar cultivos unicelulares de *Salmonella typhimurium*, *Eberthella typhosa* y *Salmonella schottmülleri* a cianuro sódico, a sublimado y a sulfato cúprico en concentraciones considerablemente más elevadas que las que impiden el crecimiento de estirpes no habituadas. Se logró resultado positivo, y las estirpes habituadas conservaban su resistencia incluso después de haber recibido, en el transcurso de dieciocho meses, 55 pases por caldo puro. Pero cuando las estirpes no adaptadas se sembraban en placas de agar, a las que se habían añadido las sustancias citadas, se desarrollaban en un número muy restringido de colonias, cuya siembra e investigación cuidadosa demostró que constaban de células que eran capaces de crecer en concentraciones de los productos químicos tan elevadas como aquellas a las que los cultivos iniciales sólo se habían adaptado por habituación paulatina. Admitieron, pues, que en este caso se trataba de variantes preexistentes, que, considerando su fijez a al heredarse, debieran considerarse, con gran probabilidad, como mutantes, y que la habituación de los cultivos unicelulares a los agentes antibacterianos probablemente se debería a la selección, por tal cultivo, de estas variantes resistentes, de modo que, finalmente, toda la población bacteriana estaba constituida por células resistentes. Tanto respecto a la técnica experimental como a la interpretación hipotética de los

resultados obtenidos, esta investigación es análoga a una serie de trabajos. Pero SEVERENS y TANNER consideran la posibilidad de que las células resistentes no existan meramente como tales, sino que se trate de variantes que, excepcionalmente, puedan reaccionar a la acción del agente perturbador con una alteración correspondiente de su mecanismo de herencia. Esto no significa más que un intento de soslayar la siguiente improbabilidad que linda con lo imposible: que en la población originada a partir de una célula bacteriana se produzcan mutantes espontáneas que poseen originariamente una elevada tolerancia frente al sublimado, al CuSO_4 y a un número casi ilimitado de otras sustancias. Sin embargo, se trata de una demostración con medios inadecuados "porque en lugar de las mutantes producidas de modo espontáneo pueden aparecer un número igual de mutantes inducidas". La siguiente consideración pretende demostrar que tampoco existen otras posibilidades de explicación. Como es sabido, los paramaecios de una colonia procedente de una única célula multiplicada asexualmente poseen longitud desigual. Estas diferencias de tamaño no son hereditarias, y por ello se han clasificado como "modificaciones"; fueron atribuidas a influencias del medio que rodea a los paramaecios, y se consideró que el predominio de un valor medio y la relativa rareza de los tipos extremos se debe a que los factores que favorecen y los que inhiben el crecimiento longitudinal en gran parte se compensan entre sí, mientras que sólo rara vez se da el caso de que el paramaecio esté influido exclusivamente por factores del medio que favorezcan el crecimiento longitudinal o, por el contrario, por factores que le inhiban. Se puede concebir que la capacidad de adaptación a factores del medio inhibidores del crecimiento o tóxicos pueda incluirse en la misma categoría de propiedades no hereditarias y variables dentro de un cultivo puro de una bacteria. Si insistimos en la analogía con el modelo del paramaecio, habrían de ser también muy raros los ejemplares dotados con una capacidad de adaptación muy elevada; al originar éstos una colonia en una placa de agar que contenga la sustancia tóxica para la bacteria, deben producirse innumerables particiones, de modo que en este medio tal vez se den en mayor grado que en un medio líquido las condiciones para el desarrollo de una modificación persistente de la resistencia. Evidentemente, se trata sólo de una combinación para la que falta la prueba convincente. Por otra parte, en nuestra opinión, no pueden compararse entre sí las habituaciones a venenos en cultivos en medios líquidos y sólidos, y sólo servirá para probar que la opinión, muy improbable *per se*, de la existencia de innumerables variantes de resistencia,

diferentes por su especificidad, inducidas o espontáneas, en un cultivo unicelular, no parece brindar el camino apropiado para comprender los resultados experimentales.

Si la mutación inducida específicamente para protegerse contra un agente perjudicial exógeno resulta para muchos genéticos una concepción inadmisibles, crece la inverosimilitud, si se afirma que para la creación de un grado de resistencia elevado se requiere toda una serie de mutaciones sucesivas dirigidas en el mismo sentido, cada una de las cuales está dotada de mayor grado de tolerancia que la precedente. De este modo debe producirse, según M. DEMEREC (1945 a, b), la resistencia de las estirpes de *Staphylococcus pyogenes aureus* contra distintas concentraciones de penicilina. No se trataría, en este caso, de una simple mutación inducida específicamente, sino de una mutación en cadena que progresaría en una misma dirección. Considerada superficialmente esta hipótesis, ofrece cierta semejanza con la teoría desarrollada por L. HIRSZFELD para explicar la formación de los factores de grupos sanguíneos A y B y de sus variantes, a partir de un factor primogenio O [consúltese R. DOERR (1949, páginas 86 y siguiente, y págs. 93 y siguiente)]. Pero HIRSZFELD imagina un proceso que se produce a lo largo del desarrollo filogenético, y se mantiene en el concepto de mutación como alteración espontánea (no inducida) y precisa cuál es el proceso que, en su opinión, se cumple en las mutaciones en cadena; según él, se trataría de una sustitución paulatina de la sustancia O por las A o, en su caso, la B, que son dominantes en el proceso de la herencia, hasta que el estadio final resultaría A, exenta de O, o B exenta de O. Por el contrario, según DEMEREC, la mutación en cadena que conferiría la elevada resistencia a la penicilina habría de producirse en el transcurso de un experimento de laboratorio y en virtud de un proceso cuya esencia no se define, de modo que S. E. LURIA (obra citada, pág. 14) ha de plantear la discusión de si se trata de una sucesión de mutaciones que siempre afecten a la misma función, o si se trata de mutaciones independientes entre sí, que afecten a distintas funciones metabólicas del estafilococo, importantes todas para la sensibilidad frente a la penicilina: disyuntiva que a una consideración libre de prejuicio ha de despertar la duda de la justeza de la hipótesis de una mutación en cadena como causa de la elevación paulatina de la resistencia. Añadamos aún otra circunstancia. A. BONDI y C. DIETZ (1945), entre 115 estirpes de estafilococo aisladas de distintos focos infecciosos de pacientes, encontraron 16 (13,9 por 100), que eran naturalmente resistentes frente a la penicilina y que su resistencia se debía a la producción de peni-

cilinasa, fermento capaz de destruir la penicilina. Pero los mismos autores [BONDI y DIETZ (1944)] habían llegado al firme convencimiento de que las bacterias que no poseen una resistencia originaria contra la penicilina, sino que la consiguen *in vitro* o *in vivo*, de ningún modo adquieren la capacidad de producir penicilinas, de modo que la resistencia natural contra este antibiótico y la inducida específicamente parecen poseer un mecanismo completamente distinto; además, se sabe que la exaltación inducida de la resistencia no puede deberse a la existencia de supervivientes, es decir, a la selección de variantes naturalmente inmunes, preexistentes.

La hipótesis de la adaptación de C. N. Hinshelwood.

Ya se mencionó (véase pág. 82) que HINSHELWOOD no cree que la selección de tipos preexistentes pueda ser la única causa de la elevación de la resistencia de las bacterias contra sustancias que les son tóxicas, porque si se considera el número de estas sustancias, frente a las que ya se han observado habituaciones, habría que admitir un número igualmente grande y, por este motivo absurdo, de tipos resistentes, preexistentes y distintos entre sí.

HINSHELWOOD aduce, como nuevo argumento contra la hipótesis de la selección, los hechos que parecen demostrar la reversibilidad de las elevaciones de la resistencia. Con frecuencia, las células bacterianas habituadas a un veneno pierden la tolerancia adquirida cuando se cultivan a través de una serie de pases en el mismo medio, pero exento del veneno. Pero la velocidad de multiplicación de las células previamente habituadas al veneno es al parecer igual al de las células bacterianas normales, que jamás habían sufrido la influencia de la sustancia tóxica; de modo que no cabe admitir que se trate de un predominio numérico de células no entrenadas sobre las entrenadas, y, por tanto, no puede entenderse cómo las células no entrenadas podrían recuperar el predominio numérico sobre las entrenadas anteriormente si en el proceso no actuara más factor que el de la selección.

Por otra parte, el crecimiento en presencia de una sustancia tóxica para la bacteria correspondiente puede prolongarse durante tanto tiempo que, en muchos casos, no baste el simple pase por el medio exento de veneno para que se pierda la resistencia adquirida. De acuerdo con la hipótesis de la selección, existiría, al llegar a dicho estado, una estirpe pura preexistente, aislada por la progresiva eliminación de todos los tipos con menos capacidad de resistencia. Pero

se ha podido observar que tales estirpes adaptadas de modo estable pueden perder, no obstante, su tolerancia. Por ejemplo, esto es lo que sucede cuando una estirpe del *Bact. lactis aerogenes* adaptada a la proflavina se cultiva en presencia de m-cresol o de fenol, o cuando una estirpe adaptada de modo estable a las sulfonamidas se cultiva en un medio que contenga proflavina. No ha podido explicarse cómo se producen estas pérdidas de resistencia inducidas de modo específico; pero basta el simple registro de la observación para poder afirmar que la adaptación estable no puede deberse a la selección de un tipo preexistente dotado de propiedades irreversibles, a no ser que remontándose de hipótesis a hipótesis se aviniese a aceptar que el fenol en un caso, y en el otro la proflavina, inducen una "mutación regresiva inespecífica".

Las consideraciones expuestas en las páginas 72 a 75 suponen una revisión sucinta de los métodos aplicados por HINSHELWOOD y colaboradores, y la figura 2.^a informa gráficamente de los resultados obtenidos haciendo intuitiva la relación entre la duración de la fase de inhibición inicial (L) y la concentración de la sustancia tóxica para las bacterias a la que se adapta la estirpe investigada. En una serie de análisis exactos de este tipo se observó coincidencia cuantitativa entre las propiedades de las estirpes adaptadas y la concentración de la sustancia bacteriana a la que se verifica la adaptación. HINSHELWOOD, en cuya obra, ya citada, se dan pruebas detalladas de tales relaciones y se las formula matemáticamente, hace notar (en la página 216) que tales relaciones serían imposibles si las estirpes bacterianas utilizadas en el experimento fueran mezclas de biotipos, cada uno de los cuales se caracterizara por una *determinada* resistencia frente a la sustancia citotóxica, y que no pudieran transformarse unos en otros. Como las estirpes bacterianas, dentro de un intervalo unilateralmente limitado por un máximo, pueden adaptarse a cada concentración arbitrariamente elegida con un resultado característico, habría que admitir la existencia de un espectro continuo de tipos en el que estuvieran representados todos los grados de resistencia. Ahora bien, de admitirse esta suposición previa, los resultados obtenidos experimentalmente podrían haberse producido por mera selección de tipos preexistentes.

HINSHELWOOD defiende el punto de vista de que las elevaciones de la resistencia se deben a modificaciones del conjunto de células de una población bacteriana que consisten en alteraciones de la correlación de los fermentos de las bacterias que regula el crecimiento normal. Según HINSHELWOOD, el tiempo en el que se cumplen estas

alteraciones es la fase de inhibición inicial (L, véase fig. 1.^a) y no la primera parte de esta fase, en la que el crecimiento se interrumpe totalmente, sino la segunda, en la que las bacterias comienzan ya a multiplicarse, porque, como HINSHELWOOD señala acertadamente, sólo se verifica la adaptación, en el estricto sentido de la palabra, si aumenta la materia de las células bacterianas (obra citada, pág. 109). Por el contrario, en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, la duración media de una generación de la sustancia tóxica toma ya un valor determinado, de modo que parece justificada la conclusión de que en este período se trata ya de células adaptadas, mejor o peor. Si no existe en el medio nutritivo ninguna sustancia antibacteriana puede tomar L un valor mínimo que, en circunstancias especialmente favorables, puede incluso igualar la duración media de la generación en la fase logarítmica, porque las células bacterianas sembradas sean aptas y estén dispuestas para la partición. Pero si se añade al medio una sustancia tóxica para las bacterias, se prolonga considerablemente la inhibición inicial del crecimiento (L), y este alargamiento da la impresión de una duración anormal por generación. El hecho de que la duración de la generación vuelva a acortarse considerablemente en la ulterior fase de crecimiento logarítmico, pudiera atribuirse a que ya se ha conseguido una adaptación. Si la prolongación de la fase inicial de inhibición del crecimiento determinada por sustancias tóxicas se definiera como la "duración de la generación no adaptada", se daría una concepción meramente formal del fenómeno. Pero la inhibición inicial del crecimiento se considera muchas veces como el tiempo requerido para construir ciertos productos intermedios indispensables para la autosíntesis de la sustancia bacteriana hasta que alcancen un nivel necesario para que comience la fase logarítmica; pudiera pensarse que este umbral es mayor cuando el substrato nutritivo contiene una sustancia bacteriostática.

El *Bact. lactis aerogenes* (como muchas otras especies de bacterias) puede habituarse con facilidad, y con frecuencia rápidamente, a distintas sustancias antibacterianas, y la tolerancia alcanzada puede ser sumamente alta. Sin embargo, no todos los intentos de habituación de este tipo dan resultado positivo. Por ejemplo, no se observa elevación apreciable de la tolerancia del *Bac. lactis aerogenes* para el fenol; cuando este germen se cultiva a lo largo de cien pases con una concentración de fenol que inhiba parcialmente su desarrollo, a pesar de ello no se observa ninguna tendencia a adquirir las velocidades de multiplicación normales. No hay ninguna hipótesis suficientemente motivada que pueda brindar una explicación satisfactoria de este fra-

caso. Se puede comprobar, según el partido a que se pertenezca, que falta la adaptación, o aceptar arbitrariamente que en las poblaciones del *Bact. lactis aerogenes* no existen tipos resistentes o que no se producen mutantes resistentes al fenol, etc. Sorprende ciertamente que no sólo no se produzca habituación al fenol, sino que el fenol, mejor dicho, el crecimiento en un medio que contenga fenol, puede extinguir una elevación estable de la resistencia adquirida por el *Bact. lactis aerogenes* frente a la proflavina. Pero es muy dudoso que exista una relación estrecha entre estas dos propiedades del fenol. Pues la adaptación del *Bact. lactis aerogenes* a las sulfonamidas puede perderse por la proflavina, y la proflavina no cuenta entre las sustancias frente a las que resulte imposible una adaptación (consúltese fig. 2.*). En estas circunstancias parece que es de fundamental importancia la analogía con el comportamiento del hombre y de los animales de experimentación utilizados en el laboratorio, que, como es sabido, no pueden habituarse a cualquier veneno y en los que la habituación, cuando se consigue, se verifica con distinta rapidez y en distinto grado según cual sea la sustancia que se ensaya.

Aunque no pertenezcan en sentido estricto al tema de esta monografía, mencionaremos en este lugar los experimentos de los que se deduce que a partir de bacterias con el máximo habitual de temperatura de crecimiento, por habituación gradual a mayor temperatura, no se consigue obtener estirpes que se comporten como bacterias termófilas típicas [A. DIEUDONNÉ (1894), E. P. CASMAN y L. F. RETTGER (1933), A. IMSHENETZKY (1944)]. Expresándonos dentro del orden de ideas de HINSHELWOOD, al parecer existe una oposición fundamental entre las posibilidades de adaptación de las bacterias a otros substratos nutritivos o a sustancias que les sean nocivas, y la imposibilidad de la adaptación a altas temperaturas de crecimiento. El mismo HINSHELWOOD reconoce esta oposición, y considera que se debe a que la adaptación, en el primer caso, se produce por pequeñas modificaciones paulatinas que acompañan el crecimiento y que pueden actuar suavemente, mientras que la adaptación a una temperatura elevada exigiría, al parecer, el moldeamiento de una organización de nuevo tipo, algo así como la obtención experimental de una nueva especie. Sin embargo, no existe ninguna duda de que las bacterias termófilas se han originado, a consecuencia de condiciones especiales del medio, a partir de bacterias que poseían un óptimo térmico de crecimiento más bajo. Muchos bacteriólogos no admiten que las bacterias termófilas representen especies especiales procedentes de períodos geológicos más calientes que se han conservado hasta la fecha

[véase, entre otros, A. RIPPEL-BALDES (1947, pág. 135)]. No hay que considerar forzosamente como imposible la transformación de una bacteria psicrófila o mesófila en el tipo termófilo, por considerar que equivale a la obtención de nuevas especies en el laboratorio. Se han efectuado investigaciones [E. N. MISCHUSTIN (1933), N. R. DHAR y S. P. TANDON (1936)] de las que se deduce que el óptimo de vegetación de las bacterias del suelo depende de la temperatura del suelo, condicionada a su vez, por la situación geográfica:

Bacterias del suelo, especie y procedencia.	Temperatura óptima de crecimiento.
Formadoras de nitritos del suelo tropical.....	35°
» » » de la zona templada.....	25°
Azotobacter del suelo tropical.....	35°
» » » de la zona templada.....	28°
Bacterias del suelo del norte de Rusia.....	27-29°
» » » de Leningrado.....	29-31°
» » » de Crimea.....	38-39°

Además existe el resultado, citado con frecuencia, pero en nuestra opinión no comprobado nunca, de un experimento de W. H. DALLINGER, efectuado en 1887. DALLINGER cultivó a lo largo de siete años un flagelado a temperaturas que fué aumentando muy gradualmente, con el efecto final de que el protista que al principio del experimento moría a 23° terminó soportando los 70°.

Finalmente, también es erróneo dar en las termófilas sólo valor teórico a la temperatura óptima para el crecimiento o aquella precisa en que éste es aun posible. La adaptación sólo adquiere plena expresión en la amplitud de la zona de temperaturas delimitada por la mínima y la máxima en que puede apreciarse multiplicación. Este intervalo puede ser muy pequeño, como sucede con el meningococo, o muy grande, como con el *Bact. coli*. Las bacterias termófilas tampoco crecen exclusivamente a 60-80°, sino también a temperaturas bajas, y el intervalo entre la temperatura mínima y la máxima de vegetación, según la clase de termófilas, puede ser grande o pequeño. Por ejemplo, CASMAN y RETTGER experimentaron con una estirpe cuya temperatura máxima de crecimiento alcanzaba a 70° y que a 45° ya se multiplicaba muy débilmente; en cambio, P. A. HANSEN (1933), en una estirpe muy acusadamente termófila, seguía apreciando multiplicación a 20°. Además, J. K. BAARS (1) (1930) encontró estirpes

(1) Citado por A. RIPPEL-BALDES (véase éste).

mesófilas y termófilas de bacterias reductoras del azufre que, fuera de la temperatura de vegetación, parecían idénticas en todos los aspectos y podían transformarse unas en otras. Pudiera, pues, pensarse que la zona de temperaturas en que pueden multiplicarse las distintas especies de bacterias saprofitas puede haberse fijado a lo largo de extensos períodos por procesos de adaptación. Esta opinión no puede rechazarse de modo inapelable, porque no se consiga en breves experimentos de laboratorio transformaciones de un extremo a otro. Tenemos, no obstante, por seguro que en el curso de la historia de la Tierra alguna vez hubieron de desarrollarse los organismos vivientes a partir de material inerte, aunque no haya sido posible hasta la fecha reproducir experimentalmente el proceso de tal creación. J. L. PASTEUR se ha manifestado enérgicamente en contra de que el resultado negativo de sus experimentos se considere como la demostración de la imposibilidad de la generación espontánea, y (en la ulterior consecuencia de esta imposibilidad) como rehabilitación científica de la historia bíblica de la creación. Si bien fracasan casi siempre las modificaciones extremas de la temperatura de crecimiento en pruebas de laboratorio, en cambio con relativa influencia se logra transformar la temperatura óptima de crecimiento de una estirpe bacteriana en otra de nivel no muy diferente, efecto que suele conseguirse en el sentido que se desee sometiendo la estirpe a la típica prueba de habituación *in vitro*. La lista que se dió en la página 93, de las temperaturas óptimas de crecimiento de las bacterias del suelo en comarcas nórdicas, templadas y tropicales, expresa claramente que se trata de adaptaciones a las condiciones del medio. No obstante, siguiendo la tendencia dominante, pudieran interpretarse los resultados de tales tentativas de habituación como efecto de la selección de tipos existentes en toda población bacteriana normal, y dotados de la capacidad de transmitir a la descendencia la posibilidad de soportar altas temperaturas y de multiplicarse a tales niveles térmicos. Pero no se tiene en cuenta que la elevación de la temperatura óptima de crecimiento que puede conseguirse de modo experimental puede ser de muy distinto grado, y que si nos apoyamos decididamente en la hipótesis de la selección habríamos de postular la existencia de un gran número de tipos con todos los grados de resistencia al calor (consúltese a este respecto la pág. 82). Si, por el contrario, admitimos que el conjunto de células de una población bacteriana se adapta a una temperatura de crecimiento a la que se somete ésta, se entienden inmediatamente las diferencias graduales del proceso. R. J. DUBOS; que en su conocida obra *The bacterial cell*

acepta la hipótesis de la selección, opiná (obra citada, pág. 214) que apenas cabe dudar que también puede verificarse *in vivo* una selección análoga y que posee cierta importancia para la adaptación de un determinado microorganismo a la existencia parasitaria de un determinado huésped. Lo que sólo es correcto en cuanto a que la temperatura corporal del huésped y la temperatura de crecimiento del parásito pueden no ser incompatibles; pero es totalmente improbable que la coincidencia indispensable para la relación parasitaria se haya producido por selección de los correspondientes tipos existentes en poblaciones microbianas o que haya jugado algún papel en la prehistoria de una relación parasitaria. Por tanto, fundamentalmente, toda relación entre parásito y huésped debe atribuirse, en último término, a que un organismo originalmente libre se adaptó a vivir en un huésped [R. DOERR (1941)]. Ahora bien, la concepción de este proceso como la penetración de un enjambre microbiano en un huésped en el que, por una selección de los tipos correspondientes caracterizados por su temperatura de crecimiento, sus necesidades nutritivas, etcétera, se consiga fijar una relación parásito-huésped de un grado tan estrictamente específico, no sólo no se ha demostrado, sino que parece una extraña pretensión al pensamiento bien orientado biológicamente. Baste recordar las numerosas infecciones de los animales de sangre caliente que se transmiten por insectos poiquilotermos; el parásito se desarrolla en el huésped y en el transmisor a temperaturas distintas, pero determinadas, de modo que no puede pensarse en soluciones tan primitivas como la selección de tipos preexistentes.

d) *Los fenómenos de habitación en cultivos de células de animales de sangre caliente.*

Señalemos, una vez más, que en esta monografía no se desarrollarán en su totalidad los problemas de los procesos de herencia en las bacterias (1). Su tema se limita a la adaptación de células a sustancias citotóxicas que actúan desde el exterior, y pueden aducirse numerosas pruebas de que estos fenómenos no sólo se observan en las bacterias, sino en otras unidades de vida de distinto tipo y diferenciación, por ejemplo, en las levaduras y mohos, en los infusorios libres, en

(1) La tendencia de referir a un único principio todas las alteraciones de las bacterias, espontáneas o inducidas, reversibles o permanentes, no puede fundamentarse de modo suficiente, como ya se ha señalado, y puede llevar la investigación hacia rutas falsas.

los tripanosomas parásitos, etc. En todos estos casos, sin embargo, se trata de poblaciones de existencia individual breve, y por ello se tiende a pensar, más que en adaptaciones individuales, en la selección de tipos preexistentes de mayor resistencia. Por ello adquiere importancia fundamental el problema de si las células de animales de sangre caliente, que crecen y se multiplican en cultivos de tejidos, pueden adaptarse a vivir en presencia de determinados venenos. Y no sólo por tratarse de las células del organismo de los animales superiores de sangre caliente, sino porque en un conjunto de tales células, homogéneas desde el punto de vista histológico, por ejemplo, en un cultivo puro de fibroblastos, no puede admitirse la existencia de tipos resistentes, *a priori*, al veneno, de modo que parece muy poco probable la interpretación de un resultado positivo como un efecto de la selección.

Pues bien, de hecho existen informes de que cultivos de células de animales de sangre caliente (fibroblastos, epitelio del iris) pueden habituarse al Salvarsán, y a la morfina, heroína y otros alcaloides del opio. Por ejemplo, por la adición repetida de pequeñas cantidades de Neosalvarsán a un medio en el que se cultivaban fibroblastos embrionales, H. VØLLMAR y S. T. LI (1940) lograron una elevación de la resistencia tal, que apenas se observaba inhibición del crecimiento con una concentración mortal para las células sin tratamiento previo. La duración del tratamiento previo era relativamente breve, y, en consecuencia, también desaparecía rápidamente la resistencia adquirida, de modo análogo a lo observado en la resistencia inducida de las bacterias a medicamentos y en la capacidad fermentativa adquirida por las bacterias [W. J. PENFOLD (1910)]. No se ha investigado si por la actuación muy repetida o prolongada del Salvarsán se consigue también una elevación estable de la resistencia de los cultivos de células. K. SAITO (1936), M. SASAKI (1938), Y. NAKAZAWA (1938) y T. KUBO (1939) se han ocupado de la habituación de cultivos de tejidos a la morfina, codeína, heroína y otros alcaloides del opio. Han podido observar una elevación efectiva de la resistencia, ya que al principio se inhibía el crecimiento por una concentración determinada del alcaloide, mientras que, después de varios pases en la misma concentración, se desarrollaban en ella con igual rapidez que los testigos no tratados en condiciones normales. Según los datos de los autores japoneses, en los cultivos de tejidos se observa también el "fenómeno de abstinencia"; por ejemplo, si trocitos de tejido habituados a los alcaloides del opio se pasan repentinamente a un medio exento de los alcaloides, se observa una fuerte inhibición—o incluso

la interrupción— del crecimiento, que sólo después de dar 3-5 nuevos pases por medios de cultivos exentos de alcaloides, vuelve a recuperar su velocidad inicial. Por otra parte, como ni los fibroblastos ni el epitelio del iris participan de modo esencial en los efectos tóxicos de la morfina, del alcohol o del Salvarsán, ni en el mecanismo de habitación a tales sustancias del hombre o de los animales de experimentación, hemos de admitir— si suponemos correctas las observaciones citadas— que se trata de una capacidad de adaptación a condiciones nocivas del medio común a todas las células que se multiplican o crecen que no puede explicarse de modo exclusivo por la selección de tipos preexistentes capaces de resistencia.

Se ha intentado determinar la existencia, el grado y la especificidad de la resistencia adquirida por animales de experimentación frente a sustancias tóxicas, esto es la habitación a ellas, en *órganos aislados vivientes*, utilizando, evidentemente, como modelo el ensayo de SCHULTZ-DALE en útero aislado de cobayo usado como indicador del estado de anafilaxia (1910-1913). Los primeros de tales experimentos se efectuaron en 1920 por M. HAHN y H. LANGER con intestino de conejos previamente tratados durante largo tiempo con nicotina. Después se ha examinado el comportamiento del intestino aislado de animales habituados a la morfina o tratados previamente con este alcaloide, y observado que el tratamiento previo tiene como consecuencia una reducción de la sensibilidad para la morfina, tanto en el conejo como en el cobayo (lo que parece contradictorio porque ambos animales se comportan de modo distinto en el experimento de habitación a la morfina). Ahora bien, lo observado resulta explicable porque en el trozo de intestino aislado se excluye la influencia del sistema nervioso central, que juega un papel tan importante y diverso según la especie animal, en la habitación a la morfina. Además, téngase en cuenta que el ensayo de SCHULTZ-DALE en útero aislado de cobayo sensibilizado tampoco refleja siempre la reactividad del animal intacto, y modernamente ha vacilado mucho la confianza en este experimento por las investigaciones de L. B. WINTER (1944, 1945). Por tanto, en la habitación a venenos (cuyo mecanismo es mucho más oscuro que el de la anafilaxia), sustituir la reactividad de todo el organismo por el comportamiento de un órgano aislado, es una empresa aventurada que puede conducir, y de hecho ha conducido, a error.

CAPÍTULO III

APENDICE

LA INMUNIDAD NATURAL CONTRA VENENOS NO CONDICIONADA POR ANTITOXINAS.

Como es sabido, la intensidad y modo de actuar de los venenos depende de la especie animal.

El erizo posee una resistencia natural, múltiple y en parte muy elevada, contra varios venenos muy distintos entre sí, como la cantaridina, atropina, morfina, nicotina, arsenito potásico, curare, cianuro potásico, sublimado [M. A. WILLBERG (1914)]. Los conejos, como las ratas, cobayos, cabras, palomas y gallinas son bastante resistentes frente a la atropina [P. FLEISCHMANN (1910), M. CLOETTA (1908), R. METZNER (1912)]. Los gatos, caballos y bovinos reaccionan frente a la morfina no con narcosis y miosis, sino con estados de excitación, convulsiones y midriasis. La escopolamina actúa sobre el hombre y el perro, como narcótico, pero no sobre el conejo, y existe una diferencia enorme entre la sensibilidad para la histamina del cobayo y del ratón. Dentro de una determinada especie pueden observarse diferencias individuales de sensibilidad muy considerables; por ejemplo, entre conejos frente a la atropina [R. METZNER y E. HEDINGER (1912), P. FLEISCHMANN] o, de modo especialmente acusado, entre hombres frente a la cocaína [E. JOEL y F. FRÄNKEL (1924)].

Hasta la fecha, no ha podido establecerse, en general, de modo satisfactorio a qué se debe la inmunidad ante un veneno natural ni su opuesto, la sensibilidad elevada frente al mismo, ni el conjunto de formas de reacción intermedias entre estos extremos. En general se admiten *mecanismos celulares* [H. H. MEYER y R. GOTTLIEB (1933, página 18)]. Condición previa para la acción sería, por consiguiente, que se produjera el contacto entre la sustancia tóxica y las células sensibles al veneno, que tuviera como consecuencia o bien alteraciones

en la superficie de las células o a una penetración del veneno en ellas con subsiguiente almacenamiento [W. STRAUB (1902)]. Del tipo citado en segundo lugar ofrecemos un modelo monocelular en el envenenamiento de los tripanosomas; en este ejemplo nos encontramos con que el almacenamiento intracelular aparece como condición necesaria y suficiente para la acción del veneno. Pero en modo alguno debe ser éste el caso general; y, de todos modos, el contacto, la penetración y el almacenamiento no son sino procesos introductores que dan ocasión a la acción venenosa propiamente dicha, es decir, a la reacción entre la célula y el veneno; y *a priori* no resulta claro cómo debe representarse este proceso íntimo, debiendo considerarse excepcional el caso de la α -toxina del *Clostridium welchii*, cuya función bioquímica se ha logrado explicar como efecto de una lecitinasa [consúltese R. DOERR (1948, págs. 159 y siguiente)]. En estas circunstancias apenas resulta posible emitir afirmaciones concretas respecto al mecanismo de la *sensibilidad reducida o ausente*, a no ser que logremos demostrar que, como en el modelo de los tripanosomas, se impide la penetración o el almacenamiento. Pero parece probable que, en la mayoría de los casos, la causa de la inmunidad frente a los venenos, así como la de la sensibilidad para ellos, deba atribuirse también en los organismos superiores al comportamiento de *células homólogas*.

La única excepción conocida de este punto de vista general celular lo constituye la resistencia para la atropina del conejo, porque los datos bien confirmados de P. FLEISCHMANN (1910) sobre la propiedad de desintoxicar la atropina que posee la sangre de conejo, obliga a admitir en este caso una *defensa humoral*. Esta propiedad de la sangre o del suero no la presentan todos los conejos en igual grado, sino que pueden faltar en algunos o presentarse en grado reducido [P. FLEISCHMANN, R. METZNER (1912), R. METZNER y E. HEDINGER (1912)], por lo que se plantea la cuestión de si la resistencia natural del conejo frente a la atropina depende exclusivamente de la intensidad con que su suero destruya la atropina. Según los datos de P. FLEISCHMANN y R. METZNER, esto es lo que sucede, ya que en conejos que poseen sangre inactiva basta una mínima dosis de atropina para paralizar el vago, y el estado de parálisis se prolonga durante un tiempo sorprendentemente largo; mientras que, por el contrario, los efectos de la atropina sobre conejos con sangre muy activa desaparecen rápidamente. Sin embargo, se conocen especiales animales sensibles contra la atropina (hombre, gato) y otras aún más resistentes que el conejo; sin embargo, en nuestra opinión no se ha investigado sistemáticamente

si también a este respecto existe un paralelismo continuo entre la resistencia natural al veneno y la acción destructora de éste que posea la sangre. P. FLEISCHMANN (1911) no hace sino añadir sumariamente que el suero de cobayo también posee una acción desintoxicante para la atropina, que aunque enérgica es considerablemente más baja que la del suero de conejo. Aun en menor grado actúa el suero de gato [M. CLOETTA (1911) registra resultados totalmente negativos] y todavía más débilmente el de perro; el suero humano normal prácticamente no ataca a la atropina, ni estando ésta en las concentraciones más bajas. Por ello en todo caso es imposible referir exclusivamente el problema de la toxicidad relativa de la atropina a la función humoral, sino que deben jugar, también este caso, un papel importante los procesos celulares [M. CLOETTA (1908-1911), R. METZNER (1912)]. R. METZNER (1912) atribuye la acción desintoxicadora de la atropina del suero del conejo a un fermento termolábil que desdobra la atropina en tropina y ácido tropínico; en favor de esta opinión habla el sabor amargo de la mezcla inactiva de atropina y suero, y el hecho de que tales mezclas después de abandonadas durante unas semanas vuelvan a recuperar su actividad, probablemente por inactivación del fermento y resíntesis espontánea de la atropina.

Tan desconocido como la causa a que se deben la concentración o la intensidad de acción de esta sustancia en el conejo (que ofrece tan grandes variaciones individuales) es el lugar donde se forma el fermento desdoblador de la atropina. G. FLEISCHMANN (1910) estaba convencido de que el fermento no existe en conejos privados del tiroides; sin embargo, METZNER y HEDINGER (1912) no pudieron confirmar esta afirmación. E. BALISSAT (1935/36) no ha añadido apenas nada nuevo a los hechos conocidos. No obstante, pudo comprobar que en el suero del hombre no existe el factor destructor de la atropina y que su presencia o ausencia en el suero de conejo es independiente de la función o disfunción del tiroides. BALISSAT no ha tomado posición ante el mecanismo de la desintoxicación de la atropina por el suero de conejo; opina únicamente que no puede tratarse de una destrucción completa, pero limita esta afirmación a experimentos en que se mezcla 1,5 mg. de atropina con 0,2 ml. de suero. Por el contrario, otros autores [D. GLICK (1940), F. BERNHEIM y M. L. BERNHEIM (1938) y otros] han confirmado que el factor desintoxicador de la atropina es un fermento hidrolizante (una "atropinesterasa"). D. GLICK y S. GLAUBACH (1941) comprobaron que la atropinesterasa puede descubrirse, aproximadamente, en el 25 por 100 de los sueros

de todos los conejos, y que su concentración, es decir, la intensidad de su acción oscila entre 51 y 270 unidades (1).

La existencia del enzima no ha podido relacionarse con la edad ni con la raza, el sexo, el color o el peso del conejo, y parece que su falta tampoco puede hacerse depender de la existencia individual de un inhibidor. Cuando no existe en la sangre de un conejo atropinestarasa, falta también en los extractos de todos los órganos analizados; cuando existe el fermento, está contenido en la sangre con título máximo, y en el hígado en segundo lugar; parece posible que se produzca en este órgano y que la sangre no haga sino almacenarlo. En favor de esta opinión se hacen valer investigaciones, según las cuales la atropinestarasa falta en el suero de distintas especies (rana, rata, gato, perro), en cuyos extractos hepáticos, en cambio, puede descubrirse [A. J. CLARK (1912), G. S. W. SERAM (1938), W. F. VON OETTINGEN (1918), F. BERNHEIM y M. L. BERNHEIM (1938)].

Por último, hasta la fecha no ha podido emitirse una afirmación determinada acerca de si la sustancia se produce de modo espontáneo, es decir, sin impulso específico, o a consecuencia de la influencia de un determinado tipo de alimentación. De ello resulta la misma situación equívoca que se produce, de modo análogo, ante los anticuerpos naturales [R. DOERR (1949)]. Ciertamente sorprende que las especies resistentes a la atropina sean, en la mayoría de los casos, animales herbívoros que soportan bien la alimentación con belladona, de modo que hay que contar, entre las combinaciones posibles, con una inmunización enteral y, finalmente, fijada por herencia frente a los venenos de solanáceas. Según M. CLOETTA (1911) y R. METZNER (1912), parece posible habituar un conejo a la atropina, por inyecciones con atropina o por la alimentación con belladona, probablemente por exaltarse la función demoledora de la atropina ejercida por el suero sanguíneo. Pero de los datos publicados no se aprecia si los autores determinaron el efecto desintoxicador del suero antes del tratamiento específico y, de modo continuo, durante su curso. Según los datos de D. GLICK y S. GLAUBACH (1941), no parece probable la hipótesis de una inmunización enteral; sin embargo, estos autores no han efectuado ninguna tentativa directa de alimentación con belladona, que debería emprenderse de modo sistemático para esclarecer importantes cuestiones teóricas.

(1) Como unidad se designa la cantidad de enzima que en el aparato de Warburg es necesaria para, a 30° y en trescientos minutos, liberar 1 ml. de CO₂ en un volumen total de 4 ml. de disolución de bicarbonato—disolución de RINGER de una cantidad de atropina suficiente.

belonged to the class of ...

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

BIBLIOGRAFIA

- ABE, K. y H. TAKEBAYASHI (1930), Jap. J. Med. Sci. Pharmacol. (Proc.) 5, 34.
 AHLQUIST, R. P. and J. M. DILLE (1940), J. Pharmacol. 70, 301.
 AMSLER, C. (1931), Naunyns Arch. 161, 233.
 ANREP, von B. (1880), Pflügers Arch. 21, 38.
 ARLOING, F. et L. THÉVENOT (1922), C. r. Soc. Biol. 87, 12.
 ASCHOFF, J. (1938), Ztschr. f. d. gesamte exp. Med. 103, 350.
 AVERY, O. T., C. M. McLEOD and M. McCARTY (1944), J. exp. Med. 79, 137.
 BAARS, J. K. (1930), Over sulfatreductie door bacterien Diss. Delft.
 BACHRACH, E. (1926), Arch. int. Physiologie 26, 147.
 BACHRACH, E. et H. CARDOT (1922), C. r. Soc. Biol. 86, 583.
 BALISSAT, E. (1935/36), Helvetica med. acta 2, 598.
 BALODIS, K. (1933), Naunyns Arch. 173, 589.
 — (1934), Naunyns Arch. 176, 1.
 BARLOW, O. W. (1935), J. Pharmacol. 55, 1.
 BATELLI, F. und L. STERN (1910), Biochem. Ztschrift 28, 145.
 BEHREND, A. und C. H. THIENES (1933), J. Pharmacol. 48, 317.
 BERNHARD, C. G. und L. GOLDBERG (1935), Acta med. scand. 86, 152.
 BERNHEIM, F. and M. L. C. BERNHEIM (1938), J. Pharm. 64, 209.
 BEYER, K. H. and J. T. SKINNER (1940), J. Pharmacol. 68, 419.
 BIEHLER, W. (1935), Naunyns Arch. 178, 693.
 BINSWANGER, H. (1933), Arch. f. Psychiatrie 100, 619.
 BLISS, E. A. and H. C. DEITZ (1944), J. Bact. (Am.) 47, 449.
 BOCK, J. und R. B. LARSEN (1917), Naunyns Arch. 87, 15.
 BONDI, A. and C. C. DIETZ (1944), Proc. Soc. exp. Biol. Med. 56, 135.
 — (1945), Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 55.
 BONSMANN, M. R. (1930), Naunyns Arch. 156, 145.
 — (1932), Naunyns Arch. 165, 659.
 — (1933), I, Naunyns Arch. 171, 612.
 — (1933), II, Naunyns Arch. 172, 645.
 BRAUN, W. (1947), Bact. Reviews (Am.) 11, 75.
 BRIERLEY, W. B. (1929), Proc. internat. Congress Plant Scienc., II, 1629.
 BROGGI, E. (1935), Rass. Studi psich. 24, 579.
 BROWNING, C. H., J. B. COHN, S. ELLINGWORTH and R. GULBRANSON (1929),
 Proc. Royal. Soc. 105, 99.
 BUCHER, K. (1944), Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta; 2, 5.

- BUCHER, K. (1949), *Arch. int. Pharmacodyn.* 79, 336.
 BURN, J. H. (1946), *Brit. med. Bull.* 4, 95.
- CAHEN, R. (1935), *Ann. Hyg.* 13, 613.
 — (1936), I, *Arch. int. Pharmacodyn.* 53, 426.
 — (1936), II, *C. r. Soc. Biol.* 123, 488.
- CARMICHAEL, E. B. and L. C. POSEY (1933), *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 30, 1329.
 — — (1936), *J. Pharmacol.* 57, 116.
- CASMAN, E. P. and L. F. RETTGER (1933), *J. Bact. (Am.)* 26, 77.
 CHAMPY, C. et E. GLEY (1911), *C. r. Soc. Biol.* 71, 159.
 CHEN, K. K. (1928), *J. Pharmacol.* 33, 215.
 CHEN, K. K. und W. J. MEEK (1926), *J. Pharmacol.* 28, 31.
 CLARK, A. J. (1937), *Heffters Hb. der exp. Pharmakologie, Erg. Bd.* 4.
 — (1912), *Quart. J. exp. Phys.* 5, 385.
 CLOETTA, M. (1903), *Naunyns Arch.* 50, 453.
 — (1906), *Naunyns Arch.* 54, 196.
 — (1908), *Naunyns Arch. Suppl.* 119.
 — (1911), *Naunyns Arch.* 64, 472.
 — (1911), *Naunyns Arch.* 64, 427.
- CO TUT, F. (1931), *J. Pharmacol.* 41, 71.
 CURRAN, D. (1933), *Proc. Roy. Soc. Med.* 27, 489.
 CURTIS, E. (1929), *J. Pharmacol.* 35, 333.
 CUSHNY, A. R. (1913), *J. Pharmacol.* 4, 363.
- DALLINGER, W. H. (1887), *J. Roy. Mic. Soc.* 3, 1368.
 DAVENPORT and NEAL (1896), *Arch. Entwicklungsmechanik d. Organismen* 2, 564.
 DAVIES, D. S. and C. N. HINSHELWOOD (1943), *Trans. Faraday Soc.* 39, 431.
 DEMEREC, M. (1945 a), *Proc. Nat. Acad. Scienc.* 31, 16.
 — (1945 b), *Am. Missouri Botan. Garden* 32, 131.
 DEAR, N. R. and S. P. TANDON (1936), *Proc. Acad. Alahabad* 6, 35.
 DIEUDONNÉ, A. (1894), *Zentralbl. f. Bakt.* 16, 965.
 DILLER, T. (1929), *J. A. M.* 93, 939.
 DIXON, W. E. und W. E. LEE (1912), *Quart. J. exp. Physiol.* 5, 373.
 DORZHANSKY, TH. (1947), *Genetics and the origin of species*, Columbia University Press, Second edition.
- DÖBLIN, A. und FLEISCHMANN (1913), *Z. Klin. Med.* 77, 145.
 DOERR, R. (1941), *Arch. f. Virusforsch.* 2, 87.
 — (1944), *Handb. d. Virusforsch., 1. Ergänzungsband*, 271—348.
 — (1948), *Die Antigen. Immunforsch. Bd. 3*, Springer, Wien.
 — (1949), *Die Antikörper, 2. Teil*, Springer, Wien.
- VAN DONGEN, K. (1915), *Pflügers Arch.* 162, 54.
 DOWNS, A. W. and N. B. EDDY (1928), *J. Lab. and Clin. Med.* 13, 739.
 — (1932), *J. Pharmacol.* 46, 195.
- DUBOS, R. J. (1945), *The bacterial cell*. Harvard University Press.
 DULAUX, E. (1892), *Ann. Inst. Past. Paris* 6, 593.
- EDDY, N. B. (1929), *J. Pharmacol.* 37, 261.
 — (1941), in *Krueger, H., N. B. Eddy, and M. Sumwalt, Suppl. 165. Public Health Reports.*

- EDDY, N. B. and G. J. REID (1934), *J. Pharmacol.* 52, 468.
EDDY, N. B. and A. W. DOWNS (1928), *J. Pharmacol.* 33, 167.
EDMUNDS, C. W. (1904), *J. Physiol.* 11, 79.
— (1909), *J. Pharmacol.* 1, 27.
EDWARDS, O. F. and L. F. RETTGER (1937), *J. Bact. (Am.)* 34, 489.
EFFRONT, J. (1893), *C. r. Acad. Scienc.* 117, 559.
— (1894), *C. r. Acad. Scienc.* 119, 169.
— (1899), *Z. f. Spiritusindustrie* 27, 126.
— (1900), *Die Diastasen.*
— (1906), cit. por Lafar, *Handb. d. techn. Mykologie*, Jena 5, 303.
— (1920/21), *Physiol. Abstracts* 5, 437.
VAN EGMOND, A. A. J. (1911), *Naunyns Arch.* 65, 197.
EHRlich, P. (1907), *Berl. Klin. Wschr.* 44, 233, 280, 310, 341.
EICHLER, O. (1937), *Naunyns Arch.* 187, 429.
EICHLER, O. und H. KILLIAN (1931), *Naunyns Arch.* 159, 606.
EICHLER, O. und H. MÜGGE (1932), *Naunyns Arch.* 168, 89.
EMMELIN, N. und W. FELDBERG (1948), *Brit. J. Pharmacol.* 3, 273.
ERWTEMAN, J. and P. A. HEERES (1938), *Acta med. scand.* 96, 198.
ESSER, J. (1903), *Naunyns Arch.* 49, 190.
ETTINGER, G. H. (1938), *J. Pharmacol.* 63, 82.
EWEN Mc, E. G., S. P. HARRISON and A. C. IYV (1939), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 42, 254.
EULER, v. H. (1942), *Ber. deutsch. chem. Gesellsch.* 75, 1876.

FABINYI, M. und J. SZEBEHELYI (1948), *Arch. int. Pharmacodyn.* 75, 402.
FARMER, L. (1939), *J. Immunol.* 36, 37.
FAURE, W. und S. LOEWE (1923), *Biochem. Ztschr.* 143, 47.
FAUST, E. S. (1900), *Naunyns Arch.* 44, 217.
FEINBERG, S. M. (1946), *J. A. M. A.* 132, 702.
FILDES, P. (1940), *Brit. J. exp. Path.* 21, 67.
— (1940), *Lancet* I, 955.
— (1941), *Brit. J. exp. Path.* 22, 293.
FINKLEMAN, B. (1930), *J. Physiol.* 70, 145.
FINNEGAN, J. K., P. S. LARSON and H. B. HAAG (1945), *Science* 102, 94.
FITCH, R. H. (1930), *J. Pharmacol. (Proc.)* 39, 266.
FLEISCHMANN, P. (1910), *Naunyns Arch.* 62, 518.
— (1911), *Berl. Klin. Wschr.*, 135.
FLEMING, R. und E. STOTZ (1936), *Arch. of Neur.* 35, 117.
FRIEDRICH-FREKSA, H., G. MELCHERS und G. SCHRAMM (1946), *Biolog. Zentralblatt* 65, 187.

GADDUM, J. H. and H. KWIATKOWSKI (1938), *J. Physiol.* 94, 87.
GAISBÖCK, F. (1911), *Naunyns Arch.* 66, 398.
GALE, E. F. and H. M. R. EPPS (1942), *Bioch. J.* 36, 600.
GEGENBAUER, V. (1922), *Arch. f. Hyg. (Al.)* 90, 23.
GETTLER, A. O. und A. W. FREIREICH (1935), *Ann. J. of Surgery* 27, 328.
GIOFFREDI, C. (1899), *Arch. ital. de biol.* 31, 398.
— (1899), *Münch. Med. Wschr.* 46, 95.
GLEW, E. (1911), *C. r. Soc. Biol.* 71, 352.

- GLICK, D. (1940), *J. bioch. Chem.* 134, 617.
- GLICK, D. and SUSI GLAUBACH (1941), *J. gener. Physiol. (Am.)* 25, 197.
- GOLD, H. (1929), *J. Pharmacol.* 35, 355.
- GOLDBERG, L. (1943), *Acta physiol. scand.* 5, Suppl. 16.
- GOUREWITSCH, D. (1907), *Naunyns Arch.* 57, 214.
- GRAF, O. und FLAKE, E. (1933), *Arbeitsphysiol.* 6, 141.
- GRAESSLE, O. E. and B. M. FROST (1946), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 63, 171.
- GRIFFITH, F. (1928), *J. Hyg. (Brit.)* 27, 113.
- GRODE, J. (1912), *Naunyns Arch.* 67, 172.
- GROSS, E. G. and V. THOMPSON (1940), *J. Pharmacol.* 68, 413.
- GRUBER, C. M. and G. F. KEYSER (1946), *J. Pharmacol.* 86, 186.
- GUNN, J. A. (1923), *Physiol. Rev.* 3, 41.
- GÜNZBURG, L. (1922), *Biochem. Ztschr.* 129, 549.
- HAFNER, F. und F. WIND (1926), *Naunyns Arch.* 116, 125.
- HALE, W. (1909), *J. Pharmacol.* 1, 39.
- HAHN, M. und H. LANGER (1920), *Z. Hyg.* 90, 22.
- HANSEN, P. A. (1933), *Arch. f. Microbiol.* 4, 23.
- HASSELBACH und J. LARSEN (1940), *Nordisk Med.* 8, 2397.
- HATCHEE, R. A. (1904), *Am. J. Physiol.* 11, 17.
- HAUPT (1886), cit. per Joel und Fränkel.
- HAUSMANN, W. (1907), *Die Gewöhnung an Gifte. Ergebn. d. Physiol.* 6, 58.
- HEFFTER, A. und E. KEESER (1927), *Heffters Hdb. exp. Pharmakol.* 3, 494.
- HIGIER, H. (1911), *Münch. Med. Wschr.* 58, 503.
- HILDEBRANDT, F. (1929), *Gewöhnung an Gifte, Handb. d. norm. u. path. Physiologie* 13, 833.
- HINDEMITH (1938), cit. per O. EICHLER (1938), *Kaffee und Koffein*, Berlin. Julius Springer.
- HINSHELWOOD, C. N. (1946), *The chemical kinetics of the bacterial cell*, Oxford.
- HIRSCH, H. (1916), *Biochem. Ztschrift* 77, 129.
- HOOKE, S. B. and W. C. BOYD (1940), *J. Immunology* 38, 479.
- HORST, K., R. E. BUXTON, and W. D. ROBINSON (1934), *J. Pharmacol.* 52, 322.
- HORTON, B. T., A. R. McLEAN, and W. G. CRAIG (1939), *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 14, 257.
- HOTTA, S. (1933), *Ronsh Ber.* 71, 473.
- HOUSWRIGHT, R. D. and S. A. KOSER (1944), *J. inf. dis. (Am.)* 75, 113.
- ISELL, H., A. J. EISENMANN, A. WEKLER, and K. FRANK (1948), *J. Pharmacol.* 92, 83.
- ISELL, H. and A. J. EISENMANN (1948), *J. Pharmacol.* 93, 305.
- JACOBSEN, E. und J. GAD (1940), *Naunyns Arch.* 196, 347.
- JANCSO, v. N. (1931), *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 122, 388, 393.
- (1932), *Zentralbl. f. Bakt. I. Orig.* 123, 129.
- (1932 a), *Klin. Wschr.*, 686.
- (1932 b), *Klin. Wschr.*, 1305.
- JAQUEMIN, G. (1905), *Z. f. Spiritusindustrie* 48, 450.
- JENNINGS, H. S. (1908 a), *J. exp. Zool.* 5, 577.
- (1908 b), *Proc. Americ. Philos. Soc.* 47, 393.

- JENNINGS, H. S., D. RAFFEL, LYNCH, ST. RUTE and T. M. SONNEBORN (1922),
J. exp. Zool. 62, 363.
- JETTER, W. W. (1938), *American J. Med. Sciences.* 196, 475.
- JOACHIMOGLU, G. (1916), *Naunyns Arch.* 79, 419.
- JOEL, E. (1923), *Therapie der Gegenwart* 64, 397.
- JOEL, E. und A. ETTINGER (1926), *Naunyns Arch.* 115, 334.
- JOEL, E. und F. FRÄNKEL (1924), *Erg. Inn. Med.* 25, 988.
- JOHNSTON, L. M. (1942), *Lancet* 243, 742.
- JOLLOS, V. (1913), *Biol. Zentralbl.* 33, 222.
- (1921), *Arch. Protistenkunde* 43, 1.
- (1934), *Arch. Protistenkunde* 83, 197.
- (1939), *Grundbegriffe der Vererbungslehre, insbesondere Mutation, Dauermodifikation, Modifikation, Handb. d. Vererbungswissenschaft, Bd. I, D, 1.*
- JUNGBLUT, C. W. (1923), *Z. Hyg.* 99, 254.
- JUNGMICHEL, G. (1933), *Naunyns Arch.* 173, 388.
- KALLOS, P. y W. PAGEL (1937), *Acta med. Scand.* 91, 292.
- KARADY, E. S. (1936), *Naunyns Arch.* 180, 283.
- (1941), *J. Immunology* 41, 1.
- KEESER, E. y H. A. OELKERS (1937), *Naunyns Arch.* 186, 606.
- KIESE, M. (1935), *Naunyns Arch.* 178, 342.
- KIHARA, J. (1928), *Ronäs Ber.* 48, 135.
- KINNEY Mc and R. R. MELLON (1941), *J. inf. dis.* 68, 233.
- KIRBY, W. M. M. and L. A. RANTZ (1943), *J. exp. Med.* 77, 29.
- KOBAYASHI, S. (1936), *J. Med. Assoc. Formosa* 35, 1364.
- (1937), *Ronäs Ber.* 98, 509.
- KOCHMANN, M. (1921), *Pfügers Arch.* 190, 158.
- KOHN, H. J. (1943), *Am. N. Y. Acad. Scienc.* 44, 503.
- KOHN-ABREST, E. (1948), *Précis de Toxicologie.* Doin Paris.
- KOLB, L. and A. G. Du Mez (1931), *Public Health Reports* 46, 698.
- KRUEGER, H., N. B. EDDY and M. SUMWALT (1941), *Washington Public Health Reports Suppl.* 165.
- KWIATKOWSKI, H. (1943), *J. Physiol.* 102, 32.
- KUBO, T. (1939), *Arch. exp. Zellforschg.* 23, 258.
- LANDY, M., N. W. LARKUM, E. J. OSWALD and F. STREIGHTOFF (1943), *Science* 97, 295.
- LAUBENDER, W. (1939), *Hefters Hdb. exp. Pharmakolog. Erg. Bd. 8, 1.*
- LAURENT, cit. por W. HAUSMANN.
- LEHMANN, A. J., SCHWERMA and E. RICKARDS (1945), *J. Pharmacol.* 85, 61.
- LELOIR, L. F. and J. M. MUNOZ (1938), *Biol. J.* 32, 299.
- LEMBERG, R., T. TANDY and N. E. GOLDSWORTHY (1946), *Nature* 157, 103.
- LENDLE, L. (1927), *Naunyns Arch.* 120, 129.
- LEOD Mc, C. M. (1939), *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. (Am.)* 41, 215.
- LÉVY, J. (1935), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 112, 167.
- LÉVY, H. et R. CAHEN (1933), *C. r. Soc. Biol.* 112, 167.
- LIGHT, A. B. (1931), *J. A. M. A.* 96, 823.
- LINK, TH. (1948), *Z. Immunitätsföschg. (Al.)* 104, 441.
- LOISELEUR, J. (1946-a), *C. r. Acad. Science* 222, 159.

- LOISELEUR, J. (1946 b), C. r. Acad. Scienc. 222, 461.
 — (1946 c), C. r. Acad. Scienc. 222, 978.
 — (1946 d), C. r. Acad. Scienc. 222, 1013.
 — (1947 a), C. r. Acad. Scienc. 224, 505.
 — (1947 b), C. r. Acad. Scienc. 224, 687.
 LOISELEUR, J. et M. PETIT (1947), C. r. Soc. Biol. 141, 568.
 LOTSY, J. P. (1916), Evolution by means of hybridization, Im Haag.
 — (1931), Genetica 13, 1.
 LOUBATIERES, A. (1948), C. r. Soc. Biol. 142, 1340.
 LOWANS MC., P. K. (1933), Proc. Roy. Soc. Med. 27, 489.
 LUBJA, S. E. (1947), Bact. Reviews (Am.) 11, 1.
 MAIER, H. W. (1926), Thieme Leipzig. Der Cocainismus.
 MALORNY, G. y G. ORZECHOWSKI (1940), Naunyns Arch. 196, 245.
 MARMÉ, W. (1883), Dtsche. Med. Wschr. 9, 197.
 MATOSI, R. (1932), Ztschr. f. klin. Med. 119, 268.
 MATSCHULAN, G. (1937), Naunyns Arch. 186, 113.
 MAYER, R. L., C. P. HUTTNER and C. R. SCHOLZ (1945), Science 102, 93.
 MEHNER, H. (1926), Ztschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat. 103, 220.
 METZNER, R. (1912), Naunyns Arch. 68, 110.
 METZNER, R. und E. HEDINGER (1912), Naunyns Arch. 69, 272.
 MEISSNER, C. (1903), Inauguraldissertation Leipzig.
 MERZBACHER (1929), Münch. Med. Wschr. 76, 2016.
 MEYER, H. H. und R. GOTTLIEB, Die experimentelle Pharmacologie 1933.
 MILES, W. R. (1923), J. Pharmacol. 20, 265.
 MILLER, G. H. and O. H. PLANT (1926), Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 23, 836.
 MINGOLA, QU. y E. SBOCCA (1941), Atti Accad. Italia Read. VII, pág. 2, pág. 1103.
 MISCHUTIN, E. N. (1933), Microbiol. (ruso), 2, 1933; ref. Zentralbl. f. Bakt. II, 90, 92.
 — (1935), Chemis. d. sozial. Landwirtsch. 7, 95; ref. Zentralbl. f. Bakt. II, 95, 82.
 MOIR, W. M. (1937), J. Pharmacol. 59, 68.
 MORAWITZ, P. und J. PRATT (1908), Münch. Med. Wschr. 1817.
 MORERA, V. (1928), cit. por Merzbacher.
 MYERS, H. B. (1916), J. Pharmacol. 8, 417.
 — (1918), J. Pharmacol. 11, 177.
 — (1925), J. Pharmacol. 23, 465.
 NAEGLI, C. (1881), Botanische Mitteilungen.
 NAKAZAWA, Y. (1938), Fol. pharmacol. jap. 26, 1.
 NIEDZEL, A. J. (1937), J. Lab. a. Clin. Med. 22, 1031.
 NEUSCHLOSS, S. M. (1919), Pflügers Arch. 176, 223.
 — (1920), Pflügers Arch. 178, 61.
 NEWMAN, H. W. and J. CARD (1937), J. Pharmacol. 59, 249.
 NEWMAN, H. W. and W. C. CUTTING (1935), J. Pharmacol. 55, 82.
 NEWMAN, H. W. and A. J. LEHMAN (1938), J. Pharmacol. 62, 301.
 NICHOLAS, J. S. and D. H. BARRON (1932), J. Pharmacol. 46, 125.
 OELKERS, H. A. (1935), Naunyns Arch. 178, 451.
 OELKERS, H. A. und F. RINTELEN (1933), Naunyns Arch. 170, 239.

- OETTEL, H. und A. KRAUTWALD (1937), *Klin. Wschr.* 16, 299.
ORZECZWSKI, G., W. GRONEMEYER und G. MALORNY (1940), *Naunyns Arch.* 196, 237.
OSBORN, H. F. (1927), *Americ. Naturalist* 61, 5.
OTTINGEN, W. F. (1918), *Naunyns Arch.* 83, 381.
PAYNE, S. (1935), *J. Pharmacol.* 53, 401.
PÉRÉ, A. (1896), *Ann. Inst. Pasteur, Paris* 10, 417.
PENFOLD, W. J. (1910), *J. Path. Bact. (Brit.)* 14, 406.
PLANT, O. H. and J. H. PIERCE (1933), *J. Pharmacol.* 49, 432.
POHLISCH, K. und F. PANSE (1934), *Schlafmittelsbrauch*. Thieme Leipzig.
POULSSON, E. (1920), *Hefters Hdb. exp. Pharmacol.* 2, 145.
PRINGSHEIM, J. (1908), *Biochem. Z.* 12, 143.
PRYCE, J. M. G., D. S. DAVIES and N. C. HINSHELWOOD (1945), *Transact. Faraday Soc.* 41, 465.
PULST, C. (1902), *Pringsheims Jahrb. f. wiss. Botanik* 37, 205.
RAFFEL, D. (1932), *J. exp. Zool.* 63, 371.
REINDELL, H. und R. WINTERER (1942), *Ztschr. klin. Med.* 141, 228.
REINITZ, N. (1929), *Skand. Arch. f. Physiol.* 57, 138.
RICHT, CH., BACHRACH et CARDOT (1921), *C. r. Acad. Scienc.* 172, 512.
RICHTER, D. (1938), *Biochem. J.* 32, 1763.
RICHTER, S. (1936), *Naunyns Arch.* 182, 720.
RIETSCHEL, H. G. (1939), *Naunyns Arch.* 193, 454.
RIPPEL-BALDES, A. (1947), *Grundriss der Mikrobiologie*, Springer-Verlag.
ROSENTHAL, S. R. und D. MINARD (1939), *J. exp. Med.* 70, 415.
ROST, E. (1929), *Toxikologie von E. Starkenstein, E. Rost und J. Pohl*, Urban-Schwarzenberg, Berlin.
ROTHENBACH, F. (1896), *Z. f. Spiritusindustrie* 19, 327.
ROTHELEN, E. (1948), *Bull. Schweiz. Akad. Wiss.* 4, 378.
RUSKA, H. und C. RUSKA-MENZE (1947), *Arch. f. Virusforschg.* 3, 341.
RUBBO, S. D. and J. M. GILLESPIE (1940), *Nature* 146, 838.
SAITO, K. (1937), *Ronsh Ber.* 96, 491.
— (1936), *Fol. pharm. jap.* 22, 183.
SALANT, W. and J. B. RIEGER (1910), *J. Pharmacol.* 1, 572.
SASAKI, M. (1938), *Arch. exp. Zellforsch.* 21, 289.
SCHAUHMANN, O. (1928), *Naunyns Arch.* 138, 208.
— (1931), *Naunyns Arch.* 160, 155.
SCHINZ, H. R. (1917), *Naunyns Arch.* 81, 193.
SCHMIDT, C. F. and A. E. LIVINGSTON (1928), *J. Pharmacol.* 33, 284.
— (1933), I, *J. Pharmacol.* 47, 411.
— (1933), II, *J. Pharmacol.* 47, 443.
SCHNABEL, A. (1924), *Klin. Wschr.* 3, 566.
SCHNABEL, A. und S. KASARNOWSKY (1924), *Klin. Wschr.* 146.
SCHUCKMANN, v., W. und G. PIEKARSKI (1940), *Arch. f. Protistenkunde* 93, 355.
SCHWEISHEIMER, W. (1913), *Deutsch. Arch. f. Klin. Med.* 109, 271.
SEEVERS, M. H. and a L. TATUM (1931), *J. Pharmacol.* 42, 217.
SELYE, H. (1937), *Endocrinology* 21, 169.

- SEMURA, S. (1934), *Ronaz Ber.* 77, 713.
- SERAM, G. S. W. (1938), *J. Path. Bact. (Brit.)* 46, 559.
- SEVERENS, J. M. and F. W. TANNER (1945), *J. Bacter. (Am.)* 49, 383.
- SIMON, A. K. und N. B. EDDY (1935), *Am. J. Psychol.* 47, 597.
- SMILGA, J. (1933), *Naunyns Arch.* 171, 162.
- SMITH, P. K. (1940), *J. Pharmacol.* 68, 1.
- SMITH, P. K. and W. E. HAMBOURGER (1936), *J. Pharmacol.* 57, 34.
- SOREL, E. (1894), *C. r. Acad. Scienc.* 118, 253.
- STANTON, E. J. (1936), *J. Pharmacol.* 57, 245.
- STANTON, E. J. and W. R. AGRICOLA (1937), *J. Pharmacol.* 59, 437.
- STARKENSTEIN, E. (1932), *Klin. Wschr.* 1697.
- STAUB, H. (1945), *Helv. Med. Acta.* 12, 613.
- (1946), *Schweiz. Med. Wschr.* 818.
- STRAUB, W. (1913), *Archivio di Fisiologid.* 1, 55.
- STRAUB, W. y H. SCHILD (1933), *Naunyns Arch.* 169, 9.
- STRIDEMAN, F. E. and H. T. JOHNSON (1948), *J. Pharmacol.* 92, 414.
- STRINGARIS, M. G. (1939), *Die Haschischsucht*, Julius Springer, Berlín.
- TATUM, A. L., M. H. SEEVERS and K. H. J. COLLINS (1929), *J. Pharmacol.* 36, 447.
- (1927), comun. previa en *J. Pharmacol.* 31, 213.
- TOYOSHIMA, J. (1929), *Ronaz Ber.* 47, 664.
- VOLLMER, H. und S. T. LI (1940), *Arch. f. exp. Zellforschg.* 24, 181.
- VOLLMER, H. (1932), *Naunyns Arch.* 166, 405.
- (1934), *Naunyns Arch.* 175, 424.
- VOLLMER, H. und S. RICHTER (1940), *Naunyns Arch.* 194, 573.
- VÖLTZ, W. und W. DIETRICH (1915), *Biochem. Ztschr.* 68, 118.
- WEDEMEYER, T. (1920), *Naunyns Arch.* 85, 399.
- WEGER, P. y C. AMSLER (1936), *Naunyns Arch.* 181, 489.
- WELLS, J. A., J. S. GRAY and C. A. DRAGSTEDT (1942), *J. of Allergy* 13, 77.
- WILLBERG, M. A. (1914), *Zeitschr. f. Bioch.* 66, 389.
- WILLCOX, W. (1933), *Proc. Roy. Soc. Med.* 27, 489.
- WINDER, C. V., M. M. ANDERSON and H. C. PARKE (1948), *J. Pharmacol.* 93, 63.
- WINTER, L. B. (1945), *J. Phys.* 104, 71.
- (1944), *J. Phys.* 102, 373.
- WINSOR, A. L. and S. J. RICHARDS (1935), cit. por F. Lickint, *Tabak und Organismus*, Hippokrates Verlag Stuttgart.
- WINSOR, A. L. and E. J. STRONGIN (1939), *J. exp. Psychol.* 16, 725.
- WOOD, W. B. jr. and R. AUSTRIAN (1942), *J. exp. Med. (Am.)* 75, 383.
- WOODS, D. D. (1940), *Brit. J. exp. Path.* 21, 74.
- WOODS, D. D. and P. FILDES (1940), *Chem. Ind.* 59, 133.

INDICE ALFABETICO DE MATERIAS

Acción, condición previa de la habituación, 22, 50, 54.

Acción (exaltación de la), posibilidad de la, 22.

Adaptación, 10, 89.

— habituación a venenos como, 55, 59, 89.

Adaptación (hipótesis de la) de C. N. Hinshelwood, 89.

— fundamento experimental, 72-75.

— significación teórica, 89 y ss.

Alcohol etílico (como antígeno), 5.

— en la prueba de selección, 7.

— habituación a, 35.

— — grado, 35.

— — mecanismo, 36.

Alcoholismo experimental, 8.

Amidona, como sustitutivo de la morfina, 54.

Anafilaxia, activa, 2.

— — anticuerpos libres y, 2.

— congénita, 3.

— la denominada anafilaxia de bacterias, 76.

Anticuerpos, libres (circulantes), 1.

— ligados a la célula, 3.

— sustancias de bajo peso molecular y, 5.

Antígenos de bajo peso molecular, 5 y 8.

— anticuerpos contra, 6.

— — capacidad de combinación, 6, 7.

— — causa, del alcoholismo, 7.

— — — del morfínismo, 7.

— — neutralización por, 7.

— — persistencia, 6.

Antitoxinas, 5, 8.

Atropina (inmunidad natural para la), 99.

— del cobayo, 99.

— del conejo, 99.

— — diferencias individuales, 99.

— — — acción destructiva del veneno por el suero sanguíneo, 100.

— — — — atropinesterasa, 100.

— — — — formación, 101.

— del hombre, 99.

Azoproteínas (antígenos), 3.

— de estricnina (véase Estricnina), 4.

— de morfina, 4.

Bact. lactis aerogenes, 66.

— adaptación a hidratos de carbono, 66.

— — velocidad de crecimiento de las variantes, 66.

— — actividad de dehidrogenasa de las variantes, 67.

— adaptación a la proflavina, 73.

Barbiturato, 39.

— habituación a, 39.

— — grado y síntomas, 39.

- Cafeína**, habituación a, 42.
 — — grado y síntomas, 42.
 — — mecanismo de acción, 44.
- Catalasa** (actividad de), en bacterias, 70.
 — aumento en la habituación a sulfanilamidas, 70.
 — crecimiento, en pH desfavorable, 71.
 — — en presencia de proflavina, 70.
- Cocaína**, habituación a, 32.
 — — grado de la, 32.
 — — síntomas de la, 32.
 — — mecanismo de acción, 34.
- Colchicina**, habituación al alcohol y, 58.
- Crecimiento** (curvas de), de bacterias en medios líquidos, 73.
 — inhibición inicial (L = lag), 72.
 — fase logarítmica, 72.
 — influencia de sustancias tóxicas, 73.
 — — retrocede por pases, 73.
 — — persisten los pases, 74.
- Crecimiento** (temperatura), de microbios parásitos, 94.
- Cultivos celulares**, habituación a venenos de, 95.
- Dehidrogenasa**, 66.
- Estricnina**, azoproteína de, 4.
 — — antisuero, específico, 4.
 — — — incapacidad de neutralizar el veneno, 4.
- Fenol**, 90.
 — antagonismo con proflavina, 90, 91.
 — no habituable para bacterias, 91.
- Fermentos** (intracelulares), de las bacterias, 66, 69.
 — alteraciones, por adaptación a sustancias nutritivas, 66.
 — — por adaptación a sustancias tóxicas, 67, 90.
 — transformación de sustancias tóxicas en sustancias nutritivas, 67, 69.
 — véase también Catalasa, Dehidrogenasa, Ureasa, etc.
- Fluorhídrico** (ácido), adaptación a, 62.
 — — de bacterias butíricas, 63.
 — — de bacterias lácticas, 63.
 — — de levaduras, 62.
 — — del *Mycoderma aceti*, 62.
- Generación** (duración media), de bacterias, 72.
- Hipersensibilidad** contra toxinas, 9.
 — fase previa a la elevación de la resistencia, 75.
- Histamina**, habituación a, 47.
 — — grado y síntomas, 48.
- Inmunes** (globulinas), 2.
- Inmunidad**, definición, 1.
 — anti-infecciosa, 1.
 — formación de anticuerpos y, 1.
- L** (= inhibición inicial del crecimiento), 72.
 — concentración de adaptación y, 74.
 — concentración de prueba y, 74.
 — comportamiento en pruebas de adaptación, 74.
 — fase de crecimiento de la adaptación, 90, 91.
- Lamarquismo**, 10.
- Levaduras** (elevación de la resistencia), contra el ácido fluorhídrico, 62.
 — — almacenamiento de cal intracelular, 62.
 — — contra arsénico y formaldehído, 63.
 — — causas, 63.
- Logarítmica** (fase) en cultivos bacterianos, 72.
- Marfanil**, 69.
- Mohos**, resistencia contra venenos metálicos, 62.
- Morfina**, como antígeno, 6.
 — habituación a, 26.
 — — grado de la, 27.
 — — síntomas de la, 26.
 — — mecanismo de acción, 28.

- Mutación**, 10, 77.
 — adaptativa (inducida), 78, 80, 88.
 — selección y, 71.
 — sin dirección, 78.
 — de varios miembros (mutación en cadena), 88.
- Mycoderma aceti**, 62.
 — elevación de la resistencia contra el ácido fluorhídrico, 62.
- Nicotina**, habituación a, 44.
 — — grado y síntomas, 45, 46.
 — — mecanismo de acción, 46.
- Penicilinas**, 88-89.
- Persistentes** (modificaciones), 66, 79, 85.
 — en bacterias, 85.
 — en protozoos (paramacios), 79.
 — — elevaciones de la resistencia contra sustancias citotóxicas, 80.
 — — — fijadas por herencia, relativas, 80.
 — — — como mutaciones de genes, 80, 81.
 — — — como alteraciones del plasma, 80, 81.
- Proceso de la adaptación de bacterias a sustancias bacteriotóxicas**, 72.
 — criterios de la adaptación conseguida, 74.
 — efectos de la adición de las sustancias bacteriotóxicas, 72, 73.
 — — retrocede por pases, 73.
 — — persiste en los pases, 74.
- Proflavina**, adaptación de bacterias a, 70, 73 y s.
 — — actividad de catalasa, 70.
 — — fenol como antagonista, 90, 92.
 — — efecto sobre la resistencia a las sulfonamidas, 70, 92.
- Protistas**, elevación de la resistencia contra sustancias microbicidas, 61.
 — — *in vitro*, 61.
 — — *in vivo*, 64.
- Protistas**, elevación de la resistencia contra sustancias microbicidas, mecanismos, 64 y s.
 — — — barreras contra la penetración, 62, 64.
 — — — alteración del sistema fermentativo, 66.
 — — — desaparición de receptores, 65.
 — — — selección de mutantes, 71.
 — — — transformación en derivados atóxicos, 62, 63.
 — — — reversibilidad, 75.
 — — — cultivo en medios exentos de veneno, 75, 84.
 — — — cultivo con antagonistas, 70, 75, 92.
 — — — mutación regresiva, 80, 90.
 — — — hipersensibilidad como frase previa, 75.
 — — — investigación del proceso, 72.
- Receptores de las células**, 24, 65.
 — habituación y, 24, 65.
 — taquifilaxia y, 17.
- Regulación compensadora**, debilitación del efecto, 20, 30, 38, 39, 55, 58.
- Resistencia hereditaria**, alteraciones inducidas en protistas, 82.
- Resistencia a medicamentos**, 61, 64, 65.
- Staphylococcus pyogenes**, 88.
 — resistencia a la penicilina, natural, 88.
 — — adquirida, 88.
- Suelo** (bacterias del), temperaturas de crecimiento, 93.
 — — temperatura del suelo y, 93.
- Sulfanilamidas y ácido p-aminobenzoico**, 68.
 — antagonismo, 68.
 — — excepción (Marfanil), 69.
 — — sustitución por otras sustancias, 69.
- Suplantación** (hipótesis de la), 68.
 — elevación de la resistencia de bacterias a sulfonamidas, 68.

- Suplantación (hipótesis de la), elevación de la resistencia de bacterias a sulfonamidas, ácido p-aminobenzoico como antagonista, 68.
 --- superproducción, 68.

Taquifilaxia, 13, 14.

- concentración de sustancia y, 18.
 — diferencia con sensibilidad inmunológica, 13.
 — diferencias con habituación, 13.
 — duración, 16, 18.
 — ejemplos de, 14.
 — esencia de la, 16.
 — inespecífica, 16.
 — *in vitro*, 19.
 — mecanismo de acción, 17.

Termófilas (bacterias), 92.

- origen, 92.
 — transformación experimental en, 92 y ss.

Tipo (transformación de) en neumococos, 82.

- relación con mutación, 82.
 — diferencia con el fenómeno de la habituación, 83.

- Tripanocidas (sustancias), 64.
 — elevación de la resistencia contra, 64.
 — — mecanismo, 64 y s.
 — modo de acción, 64.

Ureasa (Bact. coli), 71.

- comportamiento al cambiar el pH, 71.

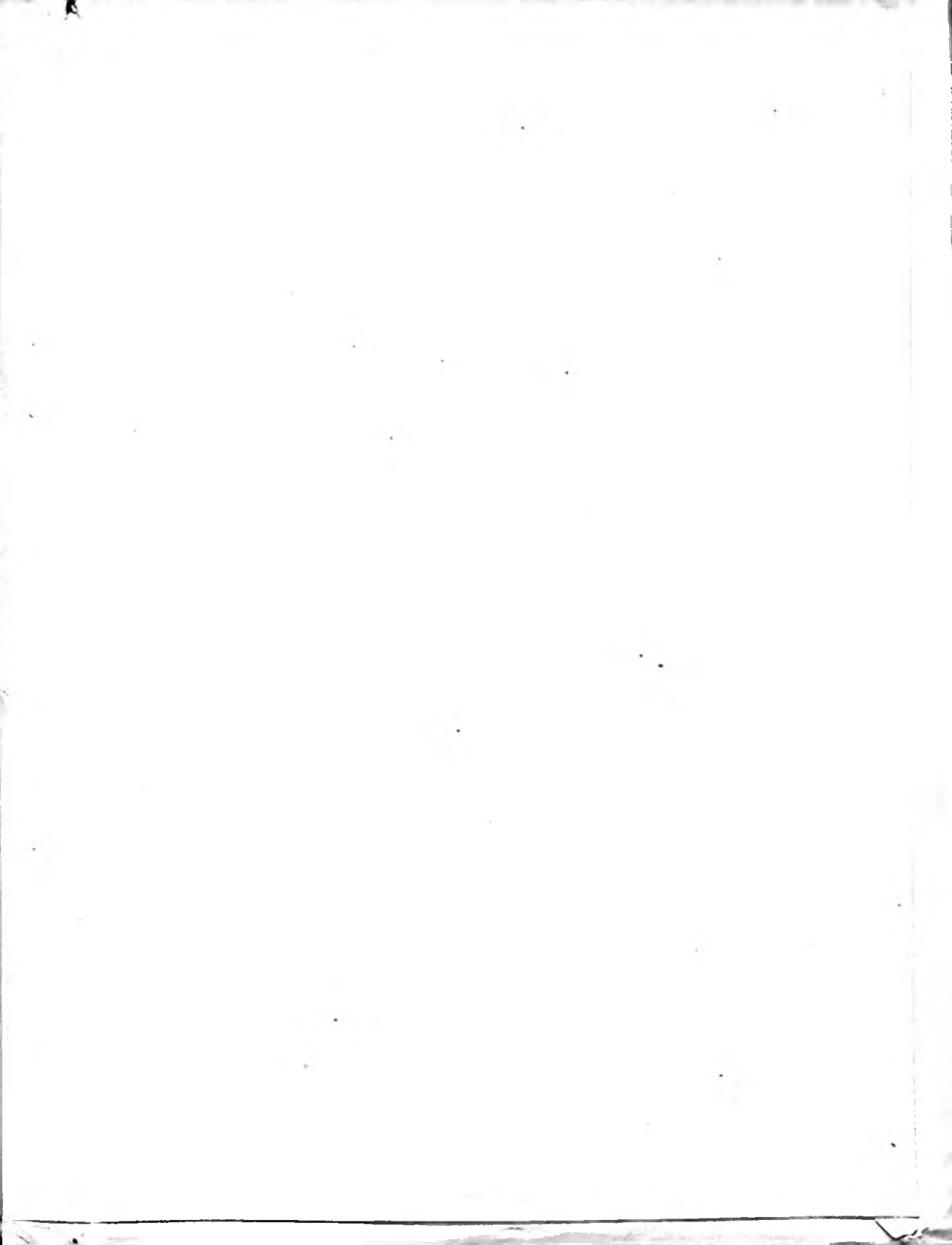
Venenos (habituación a), 2, 12.

- a toxinas antigénicas, 2.
 — a venenos no antigénicos, 2.
 — aguda (véase Taquifilaxia).
 — duración de la, 23.
 — desarrollo de la, 20.
 — concentración de la sustancia y, 20, 22, 23.
 — inespecífica, 41, 52, 57, 62, 64, 84.
 — *in vitro*, 25.

Venenos (inmunidad natural para los), 98.

- condicionada celularmente, 98.
 — condicionada humoralmente, 99.
 — — inmunidad para la atropina (véase ésta).

Vicio, 8, 12.



36
Reb0

Precio: 30 pesetas.