

UN MODEL BACTERIÀ PER A L'ESTUDI
DE LA CARCINOGENÈSI

Comunicació presentada el dia 15 de febrer de 1968 pel doctor

C. XALABARDER i PUIG

Director del l'Institut Antituberculós de Barcelona

A la gent li fa estrany que la Medicina, un xic avançada en alguns aspectes, no hagi aconseguit res pel que es refereix al càncer, malgrat l'esforç esmerçat arreu del món. Aquesta crítica, certa és clar, ignora les dificultats amb què topen les investigacions cancerològiques. Quan una malaltia pot reproduir-se experimentalment, és més fàcil que hom pugui saber-ne la causa, els mecanismes que fa servir, i és més planer que pugui cercar-se la manera de contrarestar-los. Certament, el càncer pot provocar-se als animals i a les plantes, i també són coneguts molts agents físics, químics, hormonals i també bacteries o virus que poden originar-lo, però no se sap encara res del nexa comú —si tant és que sigui únic— a través del qual s'actualitzen tots aquells agents cancerígens de tan diferents menes.

El principal motiu d'aquest desconeixement prové del fet que els dits agents no el fan manifestar de seguida d'ésser aplicats, sinó després d'un període de latència muda, de vegades molt llarg, quan la cèl·lula que sofrí directament aquell impacte ja fa temps que no existeix. Aquest fet biològic fa que a l'experimentador li calgui emprar un gran nombre d'animals que siguin homòlegs i tenir-los durant tot aquell llarg temps sota unes condicions peristàtiques i de nutrició molt uniformes i constants, si és que vol fer una feina veritablement científica. Li cal també disposar de cèl·lules normals del mateix òrgan o teixit cancerós per tal de tenir un terme de comparació. No cal remarcar que no poden tenir-se per comparables, com si fossin ben normals, les cèl·lules del mateix animal canceritzat ni, molt menys encara, les cèl·lules d'un altre animal sa de la mateixa espècie, ja que cada individu té les seves pròpies proteïnes i àcids nucleics específics. De fet, mai no poden aconseguir-se aquestes condicions, i és per això que l'experimentació actual s'ha decantat cap a un altre camp totalment empíric. Ara s'estan assajant tota mena de substàncies, siguin quines siguin i vinguin d'on vinguin, tot esperant de trobar-ne alguna que destrueixi les cèl·lules canceroses sense que perjudiqui gaire els teixits de l'hoste. És el mateix empirisme organitzat que s'empra per als antibiòtics, dels quals coneixem ben poc de llur mecanisme d'acció però amb eficàcia comprensible perquè actuen sobre gèrmens sempre aliens a les cèl·lules orgàniques. Per contra, la cèl·lula cancerosa és com les altres i, per tant,

totes les substàncies que poden atacar-la destrueixen ensems —i potser abans— les altres cèl·lules normals de l'organisme.

Esdevé, doncs, indispensable de cercar un model experimental adient per a copsar quin és, no pas l'agent inductor, sinó més aviat per quin mecanisme comença la cancerització, la qual, primordialment, no és altra cosa que l'esgarriament de l'organització del teixit en l'òrgan afectat. El veritable misteri biològic no rau pas en el fet que les cèl·lules canceroses siguin invasores i viatgeres, sinó en per què s'aguanten quietes i perfectament arrenclerades les cèl·lules dels teixits normals.

La utilització de bactèries com un bon model experimental ens permet d'esquivar aqueixes dificultats, car reuneixen les següents condicions favorables:

Producció a gratient de cèl·lules genèticament homòlogues, en nombre infinit i en temps molt breu.

Possibilitat de governar rigorosament totes les condicions químiques i físiques ambientals i de nutrició durant tot el temps que convingui.

Facilitat per a les anàlisis químiques i enzimàtiques, tant dels cossos microbians com del medi de cultiu.

Morfologia individual i de les colònies ben característica i clarament observable.

Possibilitat de provocar canvis visibles i mesurables.

Existència d'una organització social perfectament regulada.

Aquesta darrera propietat, fonamental per als estudis de carcinogènesi, ha restat ignorada fins ara perquè els tractats de Bacteriologia es mantenen fidels a dos conceptes sortosament ja dépassats: la multiplicació exclusiva per partició binària equitativa i el fet que les colònies només són pilots informes de cèl·lules exactament iguals. Ara sabem que cap d'ambdós conceptes no pot ésser mantingut seriosament. Tant les bactèries aeròbiques com les anaeròbiques comencen a multiplicar-se per conjugació extracorpòria de llurs àcids nucleics; amb el microscopi electrònic es veu bé la diferent morfologia de cada una de les substàncies coparentals. Com que aquests aparellaments tenen lloc en el medi de cultiu, és molt més probable que hi hagi anomalies de recombinació que després es manifesten en els caràcters de llur progènie i que poden ésser confosos amb autèntiques mutacions. Dit d'una altra manera: les bactèries tenen un sistema genètic obert. La simple partició, que gairebé sempre és múltiple i no pas binària, és un fenomen més tardà i de segon ordre.

En sessions anteriors us vaig mostrar amb proves fotogràfiques que la biologia de les bactèries segueix amb tot detall els conceptes fonamentals de la sociologia humana, fins al punt que cada colònia inclou tots els caràcters d'un individu multicel·lular autònom i, en certa manera, independent de les altres colònies germanes d'un mateix cultiu, perquè està

recoberta d'una mena de cutícula protectora. Per dins, està també organitzada en districtes o sectors amb llur comportament, els quals són governats des del mig de la colònia, on, gairebé segur, és on es formen les noves bactèries, segons que demostren les ones de creixement sincrònic, els nostres experiments de microcirurgia i els fallits intents d'empelts intercoloniais que us vaig presentar fa dos anys.

La formació de colònies visibles no és obligatòria per a totes les bactèries viables, però quan ho fan, adquireixen propietats noves que no tenen les que viuen lliurement en els medis líquids. L'associació colonial els reporta avantatges: millor homeostasi, la qual ajuda a la diferenciació enzimàtica que dóna lloc a més producció de toxines o d'antígens i, potser també, a caracteritzar i potenciar llur poder patogen. L'exemple més típic i complet de tot el que he dit, el tenim en l'espècie *Tyrothrix scaber*, que compleix tots els requisits bàsics necessaris per a constituir una veritable societat: aïllament físic, sistema de comunicació i distribució, ordenació de poder i ritual extern, tal com podeu veure en les següents imatges.

Si després d'aquesta demostració iconogràfica podia haver-hi algun dubte pel que fa a l'existència d'una perfecta ordenació social de les colònies bacterianes, serà prou per a esvair-lo de saber que podem anorrear-la voluntàriament i, quan això s'esdevé, no tan sols es modifica força la morfologia de les colònies, sinó que sofreixen canvis tan importants la bioquímica i la biologia de les bactèries, que podem dir amb tota raó que els hem provocat un veritable càncer.

¿Com l'hem feta, aquesta transformació maligna, i per què diem que és un càncer? Treballant preferentment amb l'espècie *Tyrothrix*, la morfologia colonial de la qual és ben característica, observarem que afegint petites quantitats de blau de metilè (Bm) —i altres colorants també— en el mateix moment de fer una nova sembra, l'aspecte de les colònies esdevé monstruós i perden la finor i la regularitat estructural que mostren en estat normal. Convé de fer notar que el dit canvi visible no té lloc fins després d'un cert període durant el qual la colònia aparentava ésser immodificada; és a dir, existeix un període de latència muda la significació del qual comentaré més endavant. El fet més important, però, és que també perden els límits definits de llur perifèria, de la qual surten filaments (no són altra cosa que corrués de bactèries) que s'infilten per l'agar del voltant.

Aquests canvis morfològics són heretables i progressius. En les ressembrades ulteriors, sense tornar a posar-hi colorant, l'aspecte extern de les colònies cada vegada és més impressionant i de vegades té la mateixa fesomia del càncer humà maligne que Broders qualifica de «gelatinós».

En els medis líquids, on no podem veure colònies prou grosses, també s'observen canvis notables; el medi esdevé llepissós i més fort de color, el creixement és més abundant i el sediment bacterià costa d'escampar-se

finament en remenar-lo, tot quedant en forma de petites laminetes més denses.

En el *Tyrothrix* normal, els elements bacil·lars són de mida mitjana, moderadament mòbils i prenen bé els colorants bàsics: amb el mètode de Gram es veuen alguns elements negatius, però la majoria es tenyeixen fortament; són cepats i de superfície ben llisa i regular. Quan els hem canceritzats, són molt més llargs, esprimatxats, mig buits i amb unes estructures internes semblants a beines de pèsol, fàcilment apreciables amb el microscopi electrònic. Acostumen a bellugar-se més de pressa, però això no ho fan pas sempre. La majoria són Gram negatius i no prenen gens bé els colorants bàsics.

Una troballa prou sovintejada per haver-nos cridat l'atenció és l'existència de conjugacions extracorpòries entre tres o més bacterïes, en lloc d'ésser entre dues com d'habitud en el *Tyrothrix* normal. Tan sovint es veuen, que sospitàrem que aquesta anomalia gènica potser era la causa única de la transformació cancerosa. Per tal d'aclarir-ho, férem cultius de *Tyrothrix* normal en medi líquid, sense Bm però amb agitació vibratòria continuada. L'aspecte de les colònies sobre agar també fou un xic monstruós, però no tingué cap dels altres caràcters que veurem de seguida. Malgrat això, és evident que la barreja gènica desmanegada fa algun paper en la transformació maligna de les bacterïes.

Entre els colorants que hem assajat només han resultat cancerígens els de caràcter bàsic; el àcids no ho han estat mai, amb la sola excepció del blau tripan. És curiós que, llevat del verd Janus i del groc Labopa, només són actius els de color blau, malgrat pertànyer a grups químics diferents. Aquesta coincidència ens portà a realitzar alguns experiments encaminats a saber si tot plegat no era un afer de longitud d'ona transmesa; resultà que no és pas això, tal com era d'esperar, car no són cancerígens tots els colorants d'aquest to. Un detall molt important perquè confirma el concepte de càncer en les bacterïes, és que no són actives totes les marques de Bm ni àdhuc tots els lots d'una mateixa fàbrica, perquè la composició dels colorants gairebé mai no és idèntica, i el mateix Bm és una barreja de violeta de metilè i d'atzur; cadascun d'aquests fa alteracions diferents i específiques a la mateixa espècie bacteriana. Això vol dir, doncs, que també en la cancerització de les bacterïes hi ha d'haver una íntima i precisa interrelació entre l'agent inductor i la cèl·lula receptora, pel qual motiu no resulten afectades totes les colònies d'una mateixa placa; sempre en resta un petit nombre amb fesomia normal. Aquesta especificitat es manifesta també en el fet que els colorants que canceritzen el *Tyrothrix* tampoc no ho fan a totes les altres espècies, sinó tan sols a unes de determinades. Quan tindrem un xic de lleure intentarem d'investigar si la receptivitat a l'agent cancerígen és un afer d'espècie, considerada individualment, o

bé si és un caràcter comú a tot un gènere o classe de bactèries que pogués tenir algun ressò taxonòmic. Una tercera dada que confirma l'esmentat caràcter específic de la cancerització: cadascun dels colorants inductors pertorba l'estructura de les colònies d'una manera diferent i característica, per bé que els trastorns bioquímics acostumen a ésser els mateixos.

Aquestes pertorbacions arquitecturals són ben sorprenents, però ho són molt més encara els canvis bioquímics i biològics que experimenta el *Tyrothrix* després d'un únic i breu contacte amb Bm. De bon començament ja observàrem que li conferia més halofilia i menys resistència a la calor; perd alguns enzims (amilasa, gelatinasa) i en sintetitza de nous (ureasa, alanina decarboxilasa, proteïnasa); adquireix poder lític sobre els eritròcits del conill d'Índies; el seu sistema deshidrogenàsic, de bon tros esllanguit, esdevé sensible al cianur i refractari a l'estímul extern amb glucosa o àcid fòrmic. Després hem anat comprovant que la pertorbació biològica és molt més profunda, ja que toca als mateixos àcids nucleics, segons que demostren les següents dades experimentals:

a) Canvis en la sensibilitat als antibiòtics, atès que aquests actuen a diferents nivells moleculars.

b) Indiferència enfront de la tripaflavina; això indica que els seus àcids nucleics no són iguals que en el *Tyrothrix* normal.

c) Conseqüència d'això, sintetitzen proteïnes diferents, apreciables en els cromatogrames de llurs hidrolitzats (fig. 4).

d) Sintetitzen nous antígens, capaços d'induir la formació d'anticossos específics.

e) Així com el *Tyrothrix* normal injectat al conill d'Índies el mata ràpidament, quan està canceritzat viu i es multiplica dins l'animal, pot refer-se de la sang i de tots els òrgans, als quals ocasiona algunes lesions histològiques, poc importants, però.

f) La modificació soferta pels àcids nucleics es posa de manifest a les corbes de titulació amb retorn dels ADN respectius. El mateix mètode aplicat a llurs ARN no mostra cap diferència mesurable.

g) Tots aquests canvis són heretables i progressius i també es transmeten per mitjà d'ultrafiltrats acel·lulars. En aquest darrer cas, però, només ho transmeten a la seva mateixa espècie i no a les altres espècies, per bé que aquestes siguin a la vegada canceritzables pel blau de metilè. Això forneix un ferm argument per a creure que el dit trastorn resideix en els àcids nucleics que, ja se sap, són estrictament específics de cada espècie, així com també sabem que no s'aparellen mai les ramificacions genètiques d'espècies diferents.

No pot, doncs, quedar cap dubte del perjudici causat als àcids nucleics. Per al cas que manquessin més proves, hem pogut registrar fotogràficament l'acció pertorbadora del Bm sobre els nucleoproteïds de les bactèries sensi-

bles en el moment que són més fàcilment accessibles per estar situats al defora del cos bacterià, és a dir, quan formen part de les ramificacions genètiques. Aquest és l'únic moment que pot tenir efecte cancerígen el Bm; en la fase M o de saturació del cultiu la seva acció és nul·la. Vegeu en aquestes imatges com la morfologia ben definida i característica del *Tyrothrix* queda com esbandida, esborrada dins un magma confús. Els aparellaments ja no són biparentals com d'ordinari, sinó que s'apilen sense ordre ni concert els elements nucleals de tres o de més bactèries. Un fet curiós és que al cap de poc tornen a tenir la fisonomia habitual, però la confusió gènica ja s'havia efectuat, i és ben clar que el resultat de tot això no pot pas ésser igual que en circumstàncies normals. Ara és el moment millor per a afegir que l'altra condició fonamental perquè tingui lloc la cancerització és la presència d'oxigen molecular; en condicions totalment anaeròbiques no hem pogut provocar-la mai, almenys en el *Tyrothrix*, però no ho hem provat encara amb espècies anaeròbiques estrictes. Ja veurem més endavant per què assenyalo aquests fets condicionants.

Els canvis bioquímics i biològics que he descrit, per ells sols no signifiquen altra cosa sinó que les bactèries s'han tornat diferents i res més. Quan hom parla del càncer en general vol dir que la seva diferència amb les cèl·lules normals consisteix a haver adquirit una evident malignitat i a fer-se invasores i tòxiques pel mateix teixit d'on procedeixen i fugen a distància en forma de les anomenades metàstasis. Si puc parlar de càncer en les bactèries és perquè també tenen aquests senyals de malignitat; són invasores i tòxiques envers llur mateixa espècie, com ho demostra llur conducta en els cultius simultanis, on les colònies canceritzades anorreen les colònies normals i ocupen el lloc d'aquestes després d'haver-los ocasionat una degeneració vítria a distància, per mitjà d'algun enzim del tot comparable a la toxohormona que tenen les cèl·lules canceroses. És fàcil de comprovar l'existència d'aquest enzim: quan la colònia atacada ha sofert ja la seva transformació vítria, encara conté bactèries viables que, en ressembla sobre agar, donen colònies d'aspecte normal, però que al cap de 24 hores desapareixen del tot per lisi.

Aquesta agressivitat envers la mateixa espècie ancestral duu aparellat un altre fet ben curiós. En sessions anteriors vaig mostrar-vos els fenòmens de canibalisme entre les colònies de *Tyrothrix* normal i d'*E. coli F.* Doncs bé: el *Tyrothrix* canceritzat és inofensiu pel dit *E. coli F.* i les seves colònies conviuen estretament en la mateixa placa sense donar senyals d'enemistat, la qual cosa indica una vegada més que el canvi enzimàtic ha estat transcendent.

Malgrat que de bell antuvi mogui a incredulitat, el cert és que el *Tyrothrix* canceritzat fa també metàstasi. És clar que no poden estar a

gaire distància perquè en els medis de cultiu semisòlids no hi ha possibilitats de circulació llunyana, però es veuen bé en aquestes imatges que us presento. Les petites colònies surten quan la colònia principal ja no creix més, estan escampades pel seu voltant i no arriben mai a fer-se de la mida d'aquesta. En algunes fotografies semblen procedir de l'esfondrament secundari d'una colònia grossa, però és molt més probable que prèviament s'hagués disgregat el grup de bacteries que després formen la colònia, a causa precisament de la manca de la inhibició de contacte —tan ben estudiada per Abercrombie, Moscona i Eagle— causa primària de la cancerització com us he dit al començament. Tots vosaltres coneixeu bé el que hom ha dit de la biologia de la cèl·lula cancerosa perquè em calgui repetir-ho ara i establir comparacions amb la biologia del *Tyrothrix* modificat pels colorants. Acabeu de veure que són iguals, àdhuc en l'existència d'un període de latència muda abans de segregar-se el caràcter patològic. Per tant, no és incorrecte ni aventurat tenir-lo per un veritable càncer de les bacteries.

Tot plegat seria només curiós, si no ens hagués servit per a estudiar quin és el mecanisme d'acció dels cancerígens. Això ha estat possible perquè aquest model bacterià ajuda força la investigació en diferents aspectes d'aquest primordial problema. Anem a veure per quins raonaments i amb quins experiments hem arribat als remarcables resultats que us mostraré després.

Efecte oxigen: Ja he dit que cal perquè el Bm tingui acció cancerígena, i això fa pensar tot seguit en un procés semblant al de les radiacions ionitzants, a les quals són més sensibles les cèl·lules ben oxigenades, potser perquè la conductància de les purines i pirimidines creix per absorció d'oxigen (Basu, 1963). Les dites radiacions poden arrencar un sol electró d'una molècula i convertir-la en un radical lliure, i tots sabeu que tant aquests com els peròxids tenen una reactivitat exagerada i progressiva que va des d'una fase estimulativa fins a la fase tòxica i destructora. Això s'esdevé igualment amb el Bm: concentracions baixes canceritzen les bacteries, però quantitats fortes les maten. Era temptador, doncs, de creure en una possible acció dels peròxids, atesa llur afinitat pels fosfats, els grups amino de les bases nucleiques, els carboxils de la histidina (Bergel, 1955) i perquè s'havia assenyalat llur caràcter mutagènic per a les bacteries (Wyss, 1947). Com sigui que les diferents tècniques per a detectar peròxids en els cultius bacterians no ens donaren resultat segur, hem afegit quantitats variables de H_2O_2 a cultius de *Tyrothrix* normal, sense blau metilè. Les colònies formades després d'això tenien fesomies quelcom diferents, però recobraren l'aspecte normal en els recultius. És cert que afegint catalasa poden evitar-se les dites alteracions —que també es produeixen amb altres oxidants com són els ferrocianurs o el permanganat— però

només el Bm ha ocasionat canvis permanents i heretables a certes espècies bacterianes.

Metilació: Essent tetrametilat el Bm, podia també pensar-se en un mecanisme de transmetilació la importància biològica del qual no cal remarcar ara. Hem fet molts assaigs amb substàncies polimetilades sense haver reeixit mai a canceritzar bactèries. Tan sols una oxícetona —capsorribina— ocasionà un curiós fenomen, independent de la cancerització, que pot ésser el tema d'una altra comunicació.

Efecte de tenyit: La ben coneguda selectivitat entre colorants bàsics i àcids nucleics tampoc no ens diu res sobre el poder cancerigen, puix que no són pas tots, només uns quants, els que resulten actius per a unes determinades espècies i no per a les restants. Altrament, el verd metil es fixa específicament als àcids nucleics, però no fa ni el més petit trastorn al *Tyrothrix*.

Estructures i transferències electròniques: Schmidt (1938) fou el primer a suggerir que el poder cancerigen depèn de la concentració d'electrons en una regió ben precisa de la molècula. Es fonamentava en el fet que la hidrogenació dels hidrocarburs, en transformar els electrons π en electrons σ , anorrea completament aquella acció. Segons ell, el càncer seria una malaltia electrònica. El desenvolupament teòric i experimental d'aquesta idea ha donat lloc a interessantíssims treballs que no ens poden entretenir ara. M'atinc només a dir que, segons Pullman i col·laboradors, com més acostats siguin els valors K —densitat d'electrons— de l'orbital superior ocupada i de l'orbital inferior buida, millor transbordadora d'electrons serà la molècula. I els valors K del blau metilè són 0.398 i 0.354 respectivament, la qual cosa li confereix grans avantatges en aquell sentit.

Malgrat tot, les propietats electròniques no són prou per a justificar llur acció cancerígena. La tionina té uns valors K idèntics però no canceritza pas el *Tyrothrix*. Per tant, només el Bm li ha fet canvis heretables de caracter gènic, que no poden comparar-se amb els que ocasionen els antimetabòlics (colquicina, acetonaftè) que havíem estudiat fa temps. Aquests darrers desorganitzen tan fortament les ramificacions genètiques que priven del tot la multiplicació de les bactèries. El Bm ho fa al nivell molecular i només es fa visible durant un breu període al començament del cultiu. A jutjar per les corbes d'absorció en el pròxim infraroig sembla que en lloc de transferir-se un sol electró s'hagi fet la transferència de dos electrons amb reestructuració molecular més profunda; és tant com dir una veritable oxireducció.

És segur, doncs, que l'acció del Bm ha d'estar implicada en un procés biològic tan refinat com és la respiració cel·lular, o sigui el transport d'electrons travessant un rengle de graons substrat-enzim, per tal de reduir

l'oxigen molecular i de formar compostos fosforilats rics d'energia. Com a resultat d'un gran nombre d'estudis sobre la respiració bacteriana, hom sap que segueix la seqüència: $\text{DNP}^{\text{H}} \rightarrow \text{flavoproteïna} \rightarrow \text{citocrom b} \rightarrow \text{citocrom c} \rightarrow \text{citocrom a} \rightarrow \text{a}_3 \rightarrow \text{O}_2$, però quan manquen oxidases o manca oxigen, l'acceptor final d'hidrogen poden ésser els nitrats o els sulfats inorgànics. És una propietat de les bactèries el fet que puguin adaptar-se amb relativa facilitat a qualsevol de les cadenes respiratòries, i el *Tyrothrix scaber* n'és un magnífic exemple.

Aquesta sèrie de fenòmens escalonats de la respiració aeròbica trontollen força per culpa del blau metilè, segons que veiem amb les dades experimentals obtingudes a redós d'alguns conceptes generalment acceptats: a) el citocrom a_3 no és sensible als cianurs (Keilin); per tant, atès que aquests darrers inhibeixen la respiració del *Tyrothrix* canceritzat, vol dir que li manca l'oxidasa terminal; b) les sals de tetrazolium reaccionen al nivell de la citocromoxidasa; justament perquè el *Tyrothrix* canceritzat és deficient d'aquest enzim, resta totalment inhibit amb quantitat de tetrazolium inferiors de molt a les que tolera indiferent el *Tyrothrix* normal; c) quan el desenvolupament d'un microorganisme és ràpid en presència de glicerol o d'etanol com a única font de carboni, el seu sistema energètic ha de passar pel sistema citocròmic (Slominski, 1953); el *Tyrothrix* canceritzat no creix de pressa en semblants condicions; per tant, la seva cadena citocròmica està afectada, almenys a l'oxidasa terminal, la qual cosa està d'acord amb els resultats espectrals que Gause i col·laboradors efectuaren amb llevats de respiració deficient. Igual que aquestes darreres, el *Tyrothrix* canceritzat fixa selectivament l'eosina en els medis amb eosina-blau metilè (Gause) o eosina-blau tripan (Nagai).

Sembla, doncs, que l'acció del blau metilè té lloc segons l'esquema que donà Slater amb propòsit ben diferent. S'estableix un curt circuit que lliga directament l'hidrogen de les flavoproteïnes amb l'oxigen, sense utilitzar la sèrie progressiva dels citocroms, sigui perquè aquesta s'hagi desconnectat o perquè aleshores no li calgui. El resultat immediat és que per aquell camí esbiaixat o drecera no poden formar-se prou enllaços pirofosfòrics (Newton, 1963) amb la consegüent minva energètica funcional. Ho confirma l'acció del dinitrofenol i el diclorofenol-indofenol, els quals també desacoblen les fosforilitzacions oxidatives i canvien molt la fisonomia de les colònies, però tampoc no és heretable la dita alteració. Per tals dificultats respiratòries, el metabolisme del *Tyrothrix* canceritzat es decanta cap a la glicòlisi. Ho confirma així l'acció del fluorur sòdic, el qual deté el seu creixement, i no, en canvi, el del *Tyrothrix* normal, justament perquè inhibeix els enzims glicolítics.

Tot això ens pot fer entendre els greus trastorns morfològics i enzimàtics produïts pels colorants que canceritzen *Tyrothrix*, però no expliquen

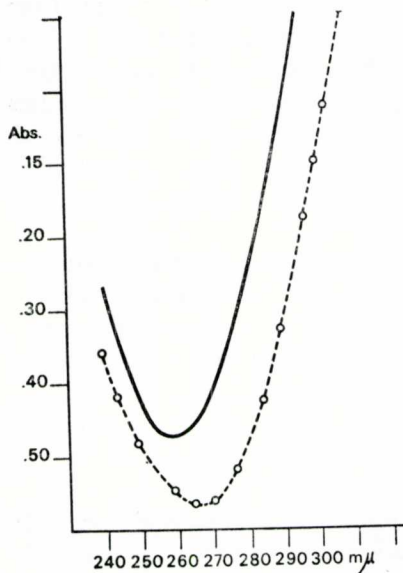


FIG. 1. — Corbes d'absorció UV de l'ADN (ratlla plena) i després d'afegir-hi blau metilè (ratlla trencada).

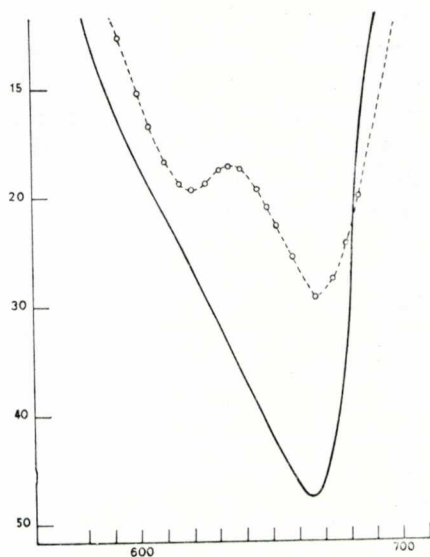


FIG. 2. — Corbes d'absorció del blau metilè (ratlla plena) i després d'afegir-hi ADN (ratlla trencada).

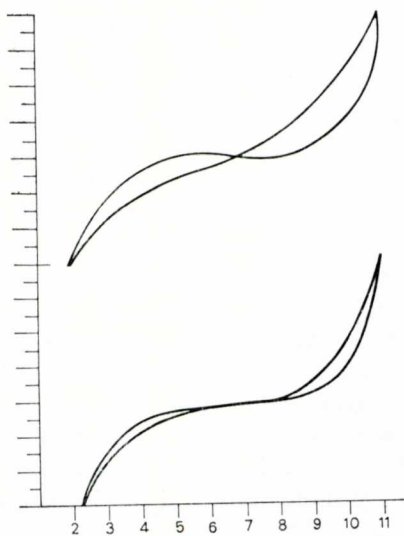


FIG. 3 — Corbes de neutralització amb retorn dels dos ADN.

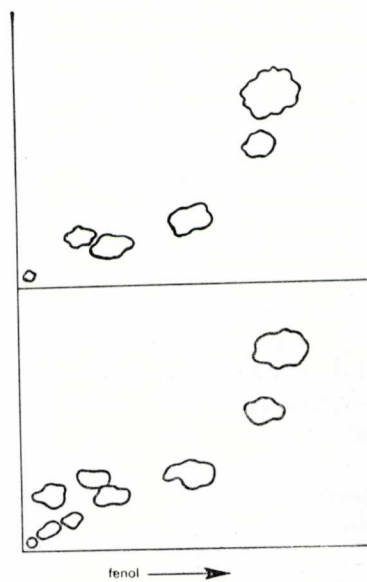


FIG. 4. — Cromatografies bidimensionals dels amoniàcids respectius.

gens per què són heretables indefinidament. Hem reunit algunes dades referents a les modificacions que també ocasionen als àcids nucleics, provinents de la dificultat respiratòria anomenada abans o bé —molt més probable— per interacció directa entre ells. Ja és sabut que el grup amino dels colorants bàsics s'uneix amb el fosfòric dels àcids nucleics que tenen càrrega negativa per damunt del pH₂. Aquesta unió salina queda inhibida gairebé del tot quan hi ha un excés del NaCl (Parker, 1949). Hem comprovat que en brou salat (NaCl 5 %) el blau metilè no canceritza el *Tyrothrix*, malgrat que quan aquest estava ja canceritzat abans, tolera concentracions salines que poden arribar al 10 %.

Els àcids nucleics canceritzats no són iguals que en estat normal. Ja he citat abans la diferent resposta enfront de la tripaflavina, inhibidora de llur síntesi. A la dilució de l'1/50.000 priva totalment la multiplicació del *Tyrothrix* normal, però ens ha calgut rebaixar-la fins a l'1/1.000 perquè inhibeixi el creixement quan està canceritzat. Hem estudiat bastant detingudament l'acció «in vitro» del blau metilè sobre els àcids nucleics del *Tyrothrix*. La màxima absorció a 255 m μ de l'ADN (30 μ g/ml) en sol. salina 0,15 M, es desvia fins a 270 m μ i també perd 25 % de viscositat relativa després d'estar en contacte 24 hores a 0°. Ja he remarcat abans que la histèresi de les corbes de titulació «d'anada i tornada» i la diferent afinitat pels colorants bàsics són molt significatives «in vivo» en la variant canceritzada.

La mateixa interacció es tradueix també a les corbes d'absorció del blau metilè a la regió visible de l'espectre. Si hom hi afegeix ADN, el seu pic de màxim s'escorre cap a 670 m μ , i en surt un altre a 625 m μ . No he trobat res d'això amb l'ARN. És molt probable, doncs, que s'hagi format un complex de transferència de càrrega (Bullock, 1967), atès que els colorants poden intercalar-se entre les parelles de bases dels àcids nucleics (Lehrman, 1964), en el qual cas hi ha una fortíssima interacció amb llurs electrons π , per la raó que aleshores la distància interanullar no passa de 3,5 Å (Duchesne, 1965) (figs. 1-3).

Cal remarcar que, tal com passa amb els efectes cancerígens, no totes les mostres d'un mateix colorant fan els mateixos efectes sobre cada un dels ADN estudiats. Això és un greu destorb per als experiments, però, ensems, és la prova evident que cal un estat de competència mútua entre la molècula del colorant i cada ADN particular. Observeu que és el mateix que hom ha comprovat en la carcinogènesi dels organismes superiors. No sé pas dir si aquestes alteracions de l'ADN s'esdevenen abans o després dels trastorns observats a la cadena respiratòria. Sigui com sigui, donen raó que es faci heretable i progressiu el canvi sofert per les bacteries, una de les principals característiques del càncer.

Tot just som al començament de l'estudi de la carcinogènesi experi-

mental, però, pel que fa a les bactèries, hem après que podem evitar el cercle viciós metabòlic que porta a la cancerització, i també hem vist que aquesta pot fer marxa enrera, àdhuc després d'haver-se manifestat permanent. Bé que encara molt incomplet, el coneixement del seu mecanisme patogènic ens ha guiat pel camí d'aconseguir-ho, fonamentant-nos en les consideracions que segueixen: No essent un sol efecte peroxidatiu, era poc probable que poguéssim contrarestar-se amb compostos només reductors però sense altres propietats acompanyants. Els assaigs fets amb vitamina C no aconseguen d'evitar clarament l'acció cancerígena del blau metilè. També fallaren altres compostos antiradiacions (cisteïna, serotonina, metil-etilguanidina, etc.). Atès que la cadena citocròmica està desllorigada i manquen fosforilitzacions oxidatives, les bactèries poden adoptar un altre camí respiratori els acceptors finals del qual són els sulfats inorgànics, sempre i quan puguin disposar-ne en quantitat i qualitat avinents, cosa poc probable en els medis de cultiu ordinari. Hem esmerçat molta activitat en l'estudi de compostos sulfurats, ja que el sofre és un element essencial en molts fenòmens biològics, sobretot en el metabolisme del fòsfor, el qual pot ésser estimulat o frenat manipulant el sofre (Harold, 1963). Hom sap també que els grups —SH anul·len els radicals lliures provinents de radiacions ionitzants, que inhibeixen els lipoperòxids, que estableixen l'estructura proteínica mitjançant enllaços H (Fraenkel-Conrat, 1956) i que poden engrandir llur corona de valències fins a 10 electrons, utilitzant l'orbital *d*, amb la qual cosa estabilitzem un carbanió veí (Pryor, 1962). I hom sap també que l'acció inhibidora dels cianurs sobre les deshidrogenases pot ésser compensada pels ditionits (Arvy, 1957).

L'interès cap aquest element, de qualitats tan favorables per al nostre intent, pujà més de to perquè temps enrera jo l'havia estudiat àmpliament per a d'altres problemes i havia sintetitzat un complex sulfurat apte per a introduir sofre a la molècula de l'ADN i d'estabilitzar les proteïnes. Aquest complex, afegit als cultius de *Tyrothrix*, priva l'efecte cancerigen del blau metilè i també pot retornar al *Tyrothrix* canceritzat tots els seus caràcters morfològics i enzimàtics normals, àdhuc la composició en aminoàcids de les seves proteïnes.

Ja ha estat prou llarga aquesta exposició de fets, i no fóra prudent d'entretenir-vos amb altres detalls experimentals. Us diré només que l'acció del dit complex no consisteix pas a neutralitzar alguna substància tòxica difusible. Semblaria versemblant que fos així, car ja he dit abans que la cancerització pot ésser transmesa per mitjà d'ultrafiltrats acel·lulars. En realitat, només és efectiu quan hi ha bactèries viables amb capacitat de formar ramificacions genètiques extracorpòries, però tenim indicis per a creure que també actua a d'altres nivells, especialment la cadena respiratòria, per raó de les seves notables propietats: cedeix electrons al blau me-

tilè i el decolora, àdhuc en presència d'oxigen molecular, més selectivament i de pressa que els flavoproteïds; també pot cedir-los directament al citocrom c i a tota la cadena fins a l'oxigen i d'acoblar ensem la síntesi de compostos rics d'energia (Aleem, 1966).

No cal dir que no hem deixat de comprovar si el *Tyrothrix* canceritzat pot retornar a la normalitat d'una manera espontània. No ha succeït mai durant els quatre anys que fa que treballem en aquest problema.

Finalment, hi afegiré un altre fet que pot tenir força significació biològica. Els cultius de *Tyrothrix* canceritzats i tornats a la normalitat amb aquell compost no poden recanceritzar-se altre cop, ni amb concentracions de blau metilè tres vegades més fortes que les que foren efectives la primera vegada. Aquesta mena de vacunació o immunitat s'ha mantingut en els recultius, i l'hem poguda transmetre —parcialment, és cert— amb ultrafiltrats acel·lulars. És, doncs, una propietat adquirida per les bacteries i que traspua cap al medi de cultiu d'una manera o altra. Atès que les membranes emprades en les ultrafiltracions tenen uns foradets de 100 m μ i poden deixar pas a les unitats elementals de les ramificacions genètiques, la mida de les quals és de 25-30 m μ , la resistència a la cancerització transmesa passivament podria ésser deguda a una nova codificació genètica. Això fóra possible, però en manca la demostració.

Tot el que he dit fins ara es refereix, només, a les bacteries i amb preferència a l'espècie *Tyrothrix scaber*. Si les coses apreses i els resultats aconseguits podran aplicar-se o no a la cancerologia dels organismes superiors, no ho sé pas. És evident, però, que els models bacterians han provat ésser una eina molt valuosa per a aquesta mena d'estudis i ens han permès de veure que la malaltia cancerosa no és fatalment irreversible, sinó que pot fer marxa enrera. No pot negar-se que això és bastant esperançador.

DISCUSSIÓ

Dr. ALEMANY

Felicita el doctor Xalabarder pel seu treball. Puix que l'estudi ha estat realitzat sobre aspectes d'anormalitat morfològica de les colònies bacterianes, no creu apropiada la denominació de carcinògenesi: en els casos de càncer hi ha influència de l'organisme sobre les cèl·lules canceroses, les quals, d'altra banda, són diferents, segons sembla, de les no afectades.

Sr. FOLCH

Pregunta al doctor Xalabarder fins a quin punt és comparable la hipotètica organització de les colònies bacterianes amb l'estructura tissular dels pluricel·lulars i, en conseqüència, fins a quin punt són traslladables els estudis d'un terreny a l'altre.

Dr. VALLMITJANA

Diu que cal que ens congratulem de l'aportació del doctor Xalabarder. Potser caldria definir el concepte de *colònia*, arreu poc precís, però és indiscutible que s'ha produït una modificació o canvi encara que no sigui possible de precisar-ne la natura exacta. Les bactèries aporten dades fonamentals per al coneixement bàsic de la Genètica, funció clorofil·lica, etc. És possible que també puguin ésser un model adient per a l'estudi de la carcinogènesi.

Dr. J. BABOT

Vol saber si tots els treballs han estat fets amb microscopi electrònic.

Dr. XALABARDER

Diu al doctor Alemany que el càncer comporta la desorganització de les cèl·lules d'un teixit i la transmissió d'aquesta alterabilitat a les cèl·lules veïnes. Això mateix és el que passa a les colònies considerades. Si el nom de càncer no plau, pot ésser canviat, però el fenomen és el mateix. Creu, a la vista dels estudis realitzats, que destruir les cèl·lules canceroses no treu cap a res; més aviat cal mirar d'esbrinar les motivacions que ocasionen la desorganització, i aleshores mirar d'eliminar-les.

Participa al senyor Folch i al doctor Vallmitjana que ell està convençut de l'organització de les colònies bacterianes. No sap fins a quin punt els estudis que ha fet amb bactèries són traslladables als pluricel·lulars, però en línies generals els creu vàlids per a qualsevol organització tissular.

Fa saber al doctor Jordi Babot que, efectivament, tots els estudis han estat fets amb microscopi electrònic.

Dr. DOMINGO

Creu que l'estudi exposat pel doctor Xalabarder hauria d'anar inclòs dins un capítol de lisi bacteriana. Mentre no coneixerem bé els mecanismes d'autòlisi serà una mica agosarat, potser, de parlar d'una malaltia concreta. Manifesta que ell hauria enfocat el problema des d'aquest punt de vista de l'autòlisi, per bé que reconeix que no ha treballat tant en aquests assumptes com el doctor Xalabarder.