

PROPIETATS DE L'AGENT CAUSAL D'UN TUMOR DEL POLLASTRE

per

F. DURAN-REYNALS

JAMES B. MURPHY

LA FIXACIÓ ESPECÍFICA PELS TEIXITS DELS ANIMALS SUSCEPTIBLES

El descobriment de què un grup de tumors malignes del pollastre podien transmetre's per un extracte lliure de cèl·lules o per tumor dessecat, ha portat a una gran diversitat d'opinions, no solament sobre la classificació d'aquest grup de tumors, sinó també sobre la naturalesa dels agents que posseeixen la propietat de produir-los. Per a molts, aquestes neoplàsies es classifiquen entre les malalties produïdes per virus. Tanmateix, hi ha certes propietats biològiques d'aquests tumors i algunes dades experimentals que difícilment poden reconciliar-se amb la teoria que aquests agents siguin similars als que causen les malalties del tipus d'infeccions per virus.

S'han fet diverses temptatives per a idear mitjans de distingir entre el grup dels virus filtrables, segurament organismes vius, i les substàncies actives, productes de cèl·lules vives, grup d'agents enzimoides. Però, pel que als tumors de pollastre fa referència, no pot considerar-se que cap dels estudis anteriors pugui donar-nos una idea definida sobre el caràcter dels seus agents causals.

Certs agents biològics, tals com el bacteriòfag, enzimes, toxines i anticossos, tots més o menys selectius respecte a les cèl·lules o substàncies sobre les quals actuen, són primerament absorbides o fixades, i de vegades aparentment inactivades pel substratum específic, mentre que les cèl·lules o substàncies no específiques no tenen acció sobre aquests agents. Per exemple, la toxina tetànica, que té una acció selectiva sobre el sistema nerviós, és neutralitzada «in vitro» pel teixit nerviós dels animals susceptibles, mentre que el ionyó, melsa i altres òrgans del mateix animal tenen un efecte petit o nul (1). Encara més, el teixit del cervell dels animals no susceptibles a la toxina tetànica no té, pràcticament, efecte neutralitzant «in vitro» sobre el verí (2) (3).

Hi ha alguns indicis de què l'agent del tumor pugui ésser fixat pels teixits en certes condicions. Pentimalli (4) observà que l'activitat del filtrat de tumor de pollastre es reduïa en contacte amb la polpa d'embrió de pollastre, i també pel teixit de reparació d'una ferida curada en el pollet, si bé en un grau menor. Els leucocits no tenen cap activitat des d'aquest punt de vista. Deelman pot fer una observació similar (5).

Aquest treball tracta també d'un estudi sistemàtic de l'acció dels teixits dels pollastres susceptibles sobre l'agent causal del tumor de pollastre, en comparació amb la dels teixits dels animals no susceptibles. S'ha publicat ja una nota preliminar sobre aquest punt (6).

MÈTODE EXPERIMENTAL

Els filtrats de tumor es preparaven pulveritzant uns 5 gr. de teixit de tumor amb sorra i afegint aleshores 100 cc. de solució de Ringer. Després d'una llarga agi-

tació, la suspensió es centrifugava per separar la sorra i les partícules grosses i el líquid sobrenedant es passava per un filtre V de Berkefeld. Els teixits que volien provar-se eren reduïts a una fina polpa en un morter amb l'addició de solució de Ringer a raó d'1 cc. de líquid per cada 2 gr. de teixit. Una quantitat mesurada de la polpa resultant es posava en un tub de centrifuga i s'hi afegia una quantitat mesurada del filtrat de tumor pel Berkefeld, barrejant-los d'una manera ben completa. Després d'un període de contacte, a la temperatura de l'habitació o a la incubadora, la mescla es centrifugava i l'activitat del líquid sobrenedant es provava per injeccions intradèrmiques en pollastres normals. L'activitat de cada filtrat es provava per la injecció d'una mostra no tractada, en forma similar.

Experiment preliminar. — Es feren cinc experiments preliminars sobre un petit nombre d'animals a fi d'agafar una idea de les relacions quantitatives i el grau d'especificitat de la reacció. Com que la tècnica era gairebé idèntica en els diferents experiments, els resultats es presenten en la taula I.

D'aquestes proves preliminars semblaria que el múscul dels pollastres susceptibles redueix l'activitat de l'agent del tumor en el filtrat. Per altra banda, el cervell i el fetge dels mateixos pollastres i el múscul, fetge i cervell de conills, no tenen cap efecte apreciable sobre la potència de l'agent causal del tumor.

Experiments de fixació i inactivació amb múscul de pollastre, conill i colom. — La següent etapa era repetir els experiments anteriors amb un animal més pròximament relacionat amb el pollastre, com el colom, fent ús de quantitats més grans de filtrat de tumor.

Es barrejaren 8 cc. de la polpa muscular amb 4 cc. filtrat de tumor fresc i es deixaren en contacte, a la

TAULA I

	Mescles	Temps de contacte	Tumor resultant del líquid que sobreneda
1.....	{ 9 cc. polpa de múscul de pollastre + 1 cc. filtrat de tumor..... } { 9 cc. polpa de múscul de conill + 1 cc. filtrat de tumor..... }	3 h. a 31°	+ + + +
2.....	{ 8 cc. polpa de múscul de pollastre + 3 cc. filtrat de tumor..... } { 8 cc. polpa de múscul de conill + 3 cc. filtrat de tumor..... } { 3 cc. polpa de cervell de pollastre + 1 cc. filtrat de tumor..... } { 3 cc. polpa de cervell de conill + 1 cc. filtrat de tumor..... }	1 h. a 37°	+ + + + + + + + + + + +
3.....	{ 8 cc. polpa de múscul de pollastre + 2 cc. filtrat de tumor..... } { 8 cc. polpa de múscul de conill + 2 cc. filtrat de tumor..... } { 8 cc. polpa de fetge de pollastre + 2 cc. filtrat de tumor..... } { 8 cc. polpa de fetge de conill + 2 cc. filtrat de tumor..... } { 3 cc. polpa de cervell de pollastre + 0'8 cc. filtrat de tumor..... } { 3 cc. polpa de cervell de conill + 0'8 cc. filtrat de tumor..... }	3 h. a 37° 1 h. a la temp. de l'habitació	+ +
4.....	{ 8 cc. polpa de múscul de pollastre + 2 cc. filtrat de tumor..... } { 8 cc. polpa de múscul de conill + 2 cc. filtrat de tumor..... }	3 h. a 37° 1 h. a la temp. de l'habitació	+ + + +
5.....	{ 8 cc. polpa de múscul de pollastre + 2 cc. filtrat de tumor..... } { 8 cc. polpa de múscul de conill + 2 cc. filtrat de tumor..... }	5 h.	+ + + +

TAULA II

Exp. n.º	Tumors de líquids sobrenedants		Tumor de polpes		Tumors de filtrat sol	
	Múscul de pollastre	Múscul de conill	Múscul de pollastre	Múscul de conill		
6....	— —	++++ ++++	—	++++	0'5 cc. ++++	1 cc. ++++
7....	++ +++ ++	++ ++++ +++	+++ +++ +	+ +++ ++	0'5 cc. ++ 5 cc. ++++	1 cc. +++ 10 cc. ++++
		Múscul de colom				
8....	—	—	—	+++	1 cc. +++	2 cc. ++++
9....	+ + —	— +++ —	— —	— —	0'5 cc. —	1 cc. —
10....	++ +	+++ ++++	+++ +++	+++ ++++	0'5 cc. +++ 2 cc. +++	1 cc. +++ 4 cc. ++++
11....	— +	++++ ++++	— ++	— ++++	1 cc. +++ 5 cc. ++++	2 cc. ++++ 5 cc. ++++
12....	++ —	+++ —	++++ —	+++ —	1 cc. +++ 2 cc. —	0'5 cc. +++ 4 cc. —
13....	+++ ++++ ++++	++ +++ ++++	++ ++++	+++ ++	0'5 cc. ++++	1 cc. ++++
14....	++ ++++ ++++	+ +++ ++++	++++ ++	+++ ++	1 cc. ++	5 cc. +++

temperatura de l'habitació, durant tres hores per als experiments 12 i 14 i durant quatre-sis hores per a tots els altres. S'injectà subcutàniament 1 cc. dels líquids sobrenedants i una quantitat similar de la polpa de teixit en el múscul pectoral de pollastres normals. Els resultats es donen en la taula II.

S'ha de tenir en compte que s'usà més filtrat de tumor amb la polpa de teixit en aquest grup d'experiments que en el primer grup. Dels nou experiments, cinc presentaren una reducció ben neta de l'activitat del filtrat després de contactar amb la polpa del múscul de pollastre, mentre un fou negatiu, i tres no presentaven una reducció apreciable de l'activitat pel contacte amb la polpa de múscul. Exceptuant el n.º 6 i probablement el n.º 8, la injecció de polpes del múscul de pollastre o dels controls, demostrà que eren ambdós igualment potents en la producció de tumors.

El fet que una proporció d'aquests experiments no presentés cap reducció definida en l'activitat del filtrat per contacte amb polpa muscular d'animals susceptibles, suggerí la possibilitat de què s'hagués usat un filtrat massa actiu. Per a provar-ho, s'usaren diferents dilucions del filtrat en el grup següent d'experiments. Els resultats estan en la taula III.

A més dels animals inclosos en la taula III, cada una de les dues sèries de líquids sobrenedants dels experiments 15 i 16, de les tres dilucions del filtrat, es provaren sobre el mateix pollastre, injectant-li 0'2 cc. de cada un intradèrmicament. Els resultats es resumeixen en la taula IV.

La fig. 1 dóna una representació esquemàtica del pollastre utilitzat en l'experiment 16, i presenta les dimensions relatives dels tumors setze dies després de la inoculació intradèrmica.

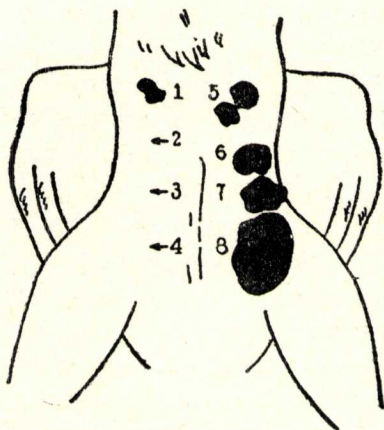


Fig. 1

TAULA III

Exp. n.º	Tumors de líquids que sobreneden			Tumors de polpes : 1 cc.	
	Múscul de pollastre	Múscul de conill		Múscul de pollastre	Múscul de conill
15.....	++ ++	+++ +++	filtrat pur	++++ +++	++++ +++
	+ +	+++ ++	1 : 1 filtrat	++ +++	++++ ++++
	— ?	++ ?	1 : 2 filtrat	+++ ++	++++ ++++
16.....	— —	++ ++++	filtrat pur	?	?
	+ —	++ +++	filtrat 1 : 1	++++	++++
	+ —	+++ +++	filtrat 1 : 2	++	+++
	+ +	+++ ++	1 : 3 filtrat	+	+++

TAULA IV

Exp. n.º		Múscul de pollastre	Múscul de conill
15....	Filtrat pur.....	++	+++
	Filtrat I : 1.....	++	++
	Filtrat I : 2.....	+	+++
16....	Filtrat pur.....		(8) ++++
	Filtrat I : 1.....	(3) —	(7) +++
	Filtrat I : 2.....	(2) —	(6) ++
	Filtrat I : 3.....	(1) +	(5) ++

Ès després d'aquests experiments que la quantitat de l'agent del tumor fixat i inactivat pel múscul del pollastre té un límit quantitatiu definit. La diferència d'activitat del múscul dels animals susceptibles i dels resistent es demostra més clarament quan els filtrats es dilueixen. Els resultats de la injecció de polpes musculars suggeriria que el poder de fixació del múscul de pollastre és més fort que el poder d'inactivació.

Fixació i inactivació pel múscul dessecat. — Era convenient saber si les propietats trobades en el múscul de pollastre eren propietats de la cèl·lula viva del teixit pulveritzat, o eren reaccions entre l'agent del tumor i els constituents del teixit. L'experiment següent demostra que el tumor de pollastre dessecat és capaç de fixar i inactivar l'agent del tumor de pollastre, gairebé tant, sinó igual que la polpa fresca.

Experiment 17. El múscul sec utilitzat en aquest experiment era del mateix pollastre que el múscul fresc utilitzat en l'experiment 6, quan la inactivació completa del filtrat havia tingut lloc. Els teixits utilitzats foren dessecats al buit sobre àcid sulfúric, i aleshores reduïts a pols grossa. 1 gr. de cada dessecat de múscul es barrejava amb 2'5 cc. de solució de Ringer i després de

l'addició de 2 cc. de filtrat fresc de tumor, es conservaven dues hores a 36° i tres hores a la temperatura de l'habitació. Després de centrifugar la barreja, 1 cc. de cada un s'injectava intradèrmicament en pollastres normals, i les polpes es donaven en les mateixes quantitats intramuscularment. L'activitat del filtrat sol es provava per la injecció de 5 cc. intramuscularment. Els resultats es donen en la taula V.

TAULA V

Tumors del líquid sobrenedant : 1 cc.		Tumors de polpes : 1 cc.		Tumors de control de 5 cc. de filtrat sol	
Múscul de pollastre	Múscul de conill	Múscul de pollastre	Múscul de conill		
+	+++++	+	+++++	+++++	+++++

L'experiment presenta d'una manera ben clara la inactivació, així com la fixació de l'agent pel múscul dessecat de pollastre.

Experiments de fixació i inactivació amb cervell i fetge de pollastre, conill i colom.—S'utilitzen les mateixes proporcions relatives de polpes d'òrgans i de filtrats de tumor fresc, que en els experiments anteriors amb múscul. Com s'indica pel número de l'experiment, aquestes proves foren fetes simultàniament amb els experiments amb múscul, i el temps de contacte fou el mateix. Els resultats es donen en les taules VI i VII.

S'ha d'advertir en els experiments 7, 13 i 14, que els experiments simultanis amb múscul donaren resultats negatius, degut a l'excessiva activitat del filtrat. Així, doncs, en el referent a fetge i múscul de pollastre, aquests experiments demostren, almenys, que no posseeixen un poder d'inactivació tan gran com el del múscul.

TAULA VI

Cervell

Exp. n.º	Tumors de líquid sobrenedant : 1 cc.		Tumors de polpes : 2 cc.		Tumors de control amb filtrat sol	
	Cervell de pollastre	Cervell de conill	Cervell de pollastre	Cervell de conill	Costat dret	Costat esquerre
7....	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	0'5 cc. ++	1 cc. +++
18....	+++ ++	+++ ++	+++	+++	5 cc. —	10 cc. —
		Cervell de colom		Cervell de colom		
10....	+++	+++	++++ ++++	++++ ++++	0'5 cc. +++ 2 cc. +++	1 cc. +++ 4 cc. +++
12....	— —	— —	+++	+++	1 cc. ++++ 2 cc. —	0'5 cc. +++ 4 cc. —

Els experiments 10 i 12 presenten una fixació accentuada amb el múscul, per la qual cosa hi ha un propi control en aquests dos experiments, i com que el filtrat usat en l'experiment 19 era feble, és possible que cap fixació no pogués ésser apreciada en aquest experiment.

Sembla, doncs, que no solament no presenten cap propietat inactivant el fetge, cervell de conills i coloms, per a l'agent del tumor, sinó que també això és veritat pels mateixos òrgans del pollastre.

A més dels anteriors experiments, es provaren dos teixits més respecte al poder de fixar l'agent del tumor del pollastre, i aquests foren el sarcoma de rata i un tumor de pollastre no filtrable. En cap dels dos teixits no hi hagué cap senyal de fixació, mentre dos de les

quatre proves-controls amb múscul de pollastre presentaven una fixació completa de l'agent.

TAULA VII

Fetge

Exp. n.º	Tumors del líquid sobrenedant : 1 cc.		Tumors de polpes : 1 cc.		Tumors de control amb filtrat sol	
	Fetge de pollastre	Fetge de conill	Fetge de pollastre	Fetge de conill	Costat dret	Costat esquerre
7....	++	++	+++	+++	0'5 cc.	1 cc.
	+	+	+++	+++	++	+++
	++	++	+	+	5 cc.	10 cc.
				++++	++++	
18....	++	++	—	—	0'5 cc.	1 cc.
	+++	+++	—	—	—	—
	++	++			5 cc.	10 cc.
				—	—	
13....		Fetge de colom		Fetge de colom		
	+++	+	++++	++	0'5 cc.	1 cc.
	+++	+++	++++	++	++++	++++
	+++	+++	++++	++		
14....	++++	++++	+++	+++	0'5 cc.	1 cc.
	++	+++	+++	++	++	++++
	+	+	+++	++		

Temptatives per a alliberar l'agent de la barreja inactiva múscul-filtrat. — Com assenyalen Marie i Tiffeneau (7), la dessecació de la barreja inactiva de cervell i toxina tetànica, allibera la toxina. Férem ús d'aquesta tècnica en una temptativa d'alliberar l'agent del tumor del múscul susceptible.

Experiment 19. Les polpes de l'experiment 11 es dessecaren al buit sobre àcid sulfúric, i quatre dies més tard s'injectaren en una quantitat equivalent a 4 cc. de polpa fresca.

Els resultats obtinguts quinze i trenta dies després de la injecció es donen en la taula VIII.

TAULA VIII

	Tumor de múscul de pollastre	Tumor de múscul de colom		Tumor de múscul de pollastre	Tumor de múscul de colom
15 dies	—	+++	30 dies....	++	++++

Sembla que l'agent ja fixat i inactivat no es separa per dessecació. En realitat, en aquest experiment, la injecció de polpes seques presentà un contrast molt més gran entre les accions de les dues menes de múscul, que no pas les barreges fresques, com pot veure's en l'experiment II.

Comparació general dels resultats amb múscul d'animals susceptibles i no susceptibles. — Si totes les proves amb músculs de pollastres susceptibles, fetes en els experiments anteriors, es comparen amb els resultats amb el múscul de colom i de conill, es veurà un sorprenent contrast entre els grups (taula IX). En les quarantaset proves amb múscul de pollastre, 76 per 100 presentaren proves indubtables d'alguna fixació de l'agent causal, i en 34 per 100 aquesta fixació fou completa.

TAULA IX

Resultats de la injecció de líquids sobrenedants

Múscul de	Nombre de pollastres inoculats	Fixació total	Fixació parcial	No fixació	Per 100 fixació parcial i total	Per 100 fixació total
Conill.....	19	0	0	19	0'0	0'0
Colom.....	24	0	0	24	0'0	0'0
Pollastre....	47	16	20	11	76,7	34'4

Resultats de la injecció de polpes

Múscul de	Nombre de pollastres inoculats	Inactiu total	Inactiu parcial	No inactiu	Per 100, inactiu total i parcial	Per 100 inactiu total
Conill.....	12	0	1	11	8'3	0
Colom.....	12	0	1	11	8'3	0
Pollastres ...	24	2	9	13	45'8	8'3

Per altra banda, en les quaranta-tres proves amb múscul d'animals no susceptibles, no donen cap exemple de fixació. Les xifres referents a la inactivació, si bé no basades sobre tantes proves, presenten un contrast fort entre el múscul de pollastre per una banda, i el de conill i de colom per l'altra.

DISCUSSIÓ

El que es dedueix d'aquest treball sembla indicar que l'agent del tumor de pollastre I és fixat, «in vitro», pel teixit muscular dels pollets susceptibles, mentre que el múscul i teixits d'animals no susceptibles, tals com el conill o el colom, no tenen aquesta acció. Fins allà on arriben aquestes observacions, àdhuc òrgans mesenquimatosos, com el cervell i el fetge del pollastre susceptible, no presenten afinitat per l'agent causal del tumor «in vitro». Són d'interès, referent a això, les observacions ja velles de Murphy i Rous (8) que demostraren que, quan un filtrat de tumor s'injectava en l'embrió de pollastre, els tumors es desenvolupaven solament en les capes mesodèrmiques de les membranes embrionàries.

Naturalment, es planteja la qüestió de si és solament la cèl·lula muscular, el sarcolema, o ambdós, que són responsables de l'acció fixadora de la polpa. Encara que aquest punt no modifica la naturalesa essencial del

fenomen, la suposició d'una transformació de la cèl·lula muscular diferenciada sota l'acció de l'agent, a cèl·lula maligna, no sembla teòricament insostenible.

La interacció entre el múscul dels pollastres susceptibles i de l'agent del tumor s'assembla, en la seva especificitat, a la fixació dels anticossos pels antígens, del bacteriòfag per la bactèria sensible i de l'enzima pel substràtum específic. La combinació del múscul amb l'agent del tumor, sembla ésser més forta que alguns dels exemples esmentats, ja que la dessecació no allibera l'agent. La delicadesa de l'agent del tumor impedeix temptatives més extenses de dissociar la combinació amb els músculs. És cert que certs virus tenen també un grau elevat d'especificitat en animals i en plantes i participen en la propietat de l'agent del tumor, de requerir matèria viva per a llur multiplicació. Tanmateix, ha estat demostrat (9) que almenys un virus típic, el virus vacunal, no és fixat o inactivat pel contacte amb teixits d'animals susceptibles. Aquesta és, possiblement, una diferència fonamental entre l'evolució de l'agent del tumor del pollastre i dels agents filtrables del grup dels virus.

CONCLUSIONS

Múscul pulveritzat de pollastres susceptibles, fixa «in vitro», en una proporció de casos, l'agent del tumor filtrable de pollastre I i en un grau menor l'inactiva, mentre que el múscul d'animals resistents, com són el conill i el colom, no té efecte. Es demostra que el poder de fixació del múscul de pollastre és superior de molt a les seves propietats inactivants.

Cervell i fetge de pollastre, conill o colom no semblen tenir ni la més petita acció sobre l'agent.

El múscul dessecat de pollastre participa de les propietats de l'òrgan fresc; i el procés de dessecació no separa l'agent causal de la mescla inactiva o lleugerament activa de múscul fresc i filtrat de tumor.

*Laboratoris de The Rockefeller
Institute for Medical Research. New York*

BIBLIOGRAFIA

1. *Wassermann, A.*, i *Takaki, T.*, Berl. Klin. Woch., n.º 1, 4 i 5; 1898.
2. *Blumenthal, F.*, Deuts. Med. Woch., XII, 185; 1898.
3. *Metchnikoff, E.*, Ann. Inst. Past., XII, 81; 1898.
4. *Pentimalli, F.*, Verh. der Deut. Pathol. Gessel., 22 Tag, June, 1927;
5. *Deelmann, H. T.*, Comunicació particular.
6. *Duran-Reynals, F.*, i *Murphy, J. B.*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., XXV, 664; 1928.
7. *Marie, A.*, i *Tiffeneau, M.*, Ann. Inst. Past., XXII, 289; 1908.
8. *Murphy, J. B.*, i *Rous, P.*, Journ. Exp. Med., XV, 119; 1912.
9. *Duran-Reynals, F.*, Aquest mateix volum; 225, C. R. Soc. Biol., 99, 6; 1928. — Journ. Exp. Med., agost de 1929.