

ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (C.S.I.C.)
GRANADA

NEUTRALIZACION DE TOXOHORMONA POR EXTRACTOS DE
LEVADURA DE PANADERIA

Por MARIA DEL CARMEN BLES BLES (1)

Ars Pharm. X, 255 (1969).

En 1948 Nakahara y Fukuoka aislaron de los tejidos cancerosos, una sustancia termostable, soluble en agua, y precipitable por el alcohol, la cual al ser inyectada a ratones, reducía la actividad de la catalasa hepática, de forma similar al efecto producido por el tejido canceroso en los organismos que lo albergan.

Así quedó establecido experimentalmente por vez primera, que existe realmente una sustancia tóxica en los tejidos de los tumores malignos, que tiene la propiedad de disminuir el nivel de la catalasa hepática. Esta sustancia puede obtenerse fácilmente por extracción con agua en caliente a partir de los tejidos malignos, y precipitación con alcohol.

Fueron también estos autores quienes propusieron el nombre de "Toxohormona" para designar el principio activo de la fracción que habían aislado, con la finalidad de evitar las confusiones a que podían inducir el nombre de "toxina cancerosa" con que se designaba a este principio entonces hipotético, en la literatura antigua, y más especialmente, para hacerla notar como un factor tóxico humoral, puesto que, como las hormonas produce su efecto (acción sobre la catalasa hepática) en órganos alejados (el hígado) del sitio donde se produce, y también porque al desaparecer esta sustancia se restaura el estado normal del organismo.

La toxohormona no sólo es la primera toxina cancerosa descrita, sino también la única que hasta el momento se ha demostrado experimentalmente.

El descubrimiento de los autores japoneses antes citados, fue confirmado rápidamente por diversos investigadores y hoy día, con las salvedades en cuanto a su especificidad de que luego haremos mención, está comprobado que la toxohormona ejerce un papel importante en la sintomatología que presentan los organismos con tumores malignos.

Nakahara y Fukuoka consideraron que la toxohormona es un producto común y específico de todas las células cancerosas; las cuales producen esta sustancia en gran cantidad durante su crecimiento. Así mismo, estos autores, llegaron a la conclusión de que la producen las células malignas vivas, ya que pudieron demostrar que la necrosis de los tejidos cancerosos no aumenta ni la cantidad ni la actividad de la toxohormona aislada.

Fueron Greenfield y Meister (1951) los primeros investigadores que lograron obtener toxohormona a partir de tejidos normales, aunque el contenido de esta sustancia en ellos era muchísimo menor que en los tejidos cancerosos. Este hecho fue explicado por Greenstein (1954) suponiendo que la toxohormona se encuentra normalmente en todos los tejidos, donde su papel, es reprimir la síntesis de ciertos enzimas; según este autor el papel de la toxohormona en el organismo normal sería el de un regulador de los niveles enzimáticos, y solamente actúan como tóxico, cuando se produce en cantidades anormales altas, como ocurre en el caso de tejidos cancerosos.

(1) Resumen de la Tesis Doctoral leída el día 18 de mayo de 1968 y que mereció la calificación de "Sobresaliente cum Laude".

Nakahara y Fukuoka (1959), aún cuando siguieron considerando la toxohormona como un producto específico de la célula cancerosa, cuya presencia en el organismo es responsable de los efectos tóxicos que afectan a los seres que albergan tumores malignos, encontraron igualmente, que la toxohormona existe en los tejidos normales, pero en una proporción tan pequeña que no puede considerarse como una entidad dentro de ellos; también ellos consideraron que actúa manteniendo el nivel normal de catalasa hepática en aquellos lugares en que dicha sustancia ejerce su acción.

Esta teoría de que la producción de toxohormona en cantidades apreciables era una propiedad exclusiva de la célula cancerosa, se sostuvo durante mucho tiempo; incluso cuando Dounce y Shanewise (1950) demostraron que las ratas leprosas tenían un nivel de catalasa hepática más bajo que el nivel normal de este enzima.

Tampoco hizo cambiar de idea, el hecho de que Kato y col. (1950), lograran hacer disminuir el nivel de catalasa hepática en ratones mediante una inyección de la raza virulenta del bacilo tuberculoso, ya que incluso los mismos autores, atribuyeron este hecho, a una reacción alérgica del tejido.

A partir, sin embargo, de 1960, una serie de nuevos descubrimientos, han demostrado que la toxohormona no puede seguir siendo considerada como un producto específico de las células cancerosas. En 1961 Callao y Montoya, demostraron que puede aislarse de levaduras y de bacterias con deficiencia respiratoria (razas DR) sustancias con la misma actividad biológica, que la toxohormona, resultados que fueron confirmados por Mifuchi y col. (1963).

Posteriormente, Kampschmidt y col. (1963) obtuvieron, a partir de diferentes tipos de bacterias (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*, etc.) preparados que presentaban gran actividad toxohormónica. Estos autores, defendieron la hipótesis de que la toxohormona no es un producto específico de la célula cancerosa, sino que es producida en los tumores por las bacterias que los contaminan. Como confirmación, los citados autores (1963) afirmaron no haber encontrado toxohormona en ningún tumor que estuviera exento de contaminación.

Esta última afirmación, sin embargo ha sido rebatida por Matsuoka y col. (1964) y más tarde por Nixon y Zimman (1966) que confirmaron la producción de toxohormona en tumores exentos de contaminaciones bacterianas, si bien tuvieron que reconocer la validez de los resultados de Kampschmidt y col. en relación con la producción de toxohormona por una serie de bacterias que normalmente se encuentran en los tumores. Por último Callao y col. (1966) han demostrado recientemente en 1966 que cuando levadura normal de panadería, se somete a un proceso de autólisis, en determinadas condiciones y en ausencia total de contaminación bacteriana, se pueden extraer de los autolisados fracciones con actividad de toxohormona. Los extractos sin autolisar, por el contrario, no presentaron ninguna actividad toxohormónica. Este hecho sugirió la idea de que en los tejidos malignos la producción de toxohormona podría deberse igualmente a un proceso de autólisis, bien de ellos o de los tejidos invadidos. Investigaciones posteriores de Callao y col. (1967) empleando tejidos animales de especies distintas demostraron que, al igual que ocurre en el caso de la levadura anteriormente descrito, los preparados procedentes de tejidos autolisados, libres de contaminación bacteriana, poseían actividad de toxohormona, mientras no presentaban esta actividad los preparados procedentes de tejidos sin autolisar.

De acuerdo con estos últimos resultados y aún cuando no se poseen suficientes datos para afirmarlo categóricamente, cabe pensar que la producción de toxohormona sea una propiedad común a todas las células vivas que sufren un proceso de autólisis, lo que explicaría, de una parte, la presencia de pequeñas cantidades de esta sustancia en tejidos normales debida a la constante renovación celular, y, de otra, el alto nivel de la misma en tumores en crecimiento como consecuencia de la rápida lisis tanto de los tejidos malignos como de los normales invadidos por ellos, así como de las bacterias que crecen a expensas de los tejidos necrosados. En cuanto a la obtención de abundantes cantidades de toxohormona a partir de masas de células DR de microorganismos descrita por Callao y col. (1967) podría igualmente, explicarse por una mayor predisposición a la autólisis de dichas células, en las condiciones de experimentación.

Cualquiera que sea, no obstante, el mecanismo mediante el que se produce la toxohormona, el hecho cierto es que, los organismos que albergan tumores en crecimiento sufren una serie de trastornos, tales como anemia, alteración del timo, bazo e hígado, disminución del nivel de catalasa hepática y de hierro plasmático, etc., que, por lo que se sabe, están íntimamente relacionados con el alto nivel de toxohormona y contribuyen grandemente a los síntomas de la enfermedad.

Por consiguiente aún considerando la producción de toxohormona como un fenómeno no específico de las células cancerosas, hemos de admitir que su presencia contribuye, al menos en parte, a desplazar el equilibrio en favor de las células malignas en la competencia establecida entre estas y las células normales, en razón del efecto tóxico que ejerce sobre estas últimas.

Naturalmente, si esto ocurre en el caso de células de organismos superiores, es lógico pensar que fenómenos del mismo tipo ocurran en poblaciones de microorganismos en las que coexisten células normales y células que, como las mutaciones DR, dan lugar a cantidades apreciables de factores del tipo de la toxohormona. Es decir, en estas poblaciones mixtas las mutaciones DR deberían competir con éxito con las células normales, y a la larga, eliminarlas de los medios de cultivo.

Como en el caso de las células cancerosas (Warburg, 1956) el metabolismo energético de las mutaciones DR, al carecer de cadena transportadora de electrones o tenerla defectuosa, es menos eficiente que el de las células normales por lo que sólo podrían competir con estas últimas, merced a la producción de factores tóxicos, uno de los cuales puede ser la toxohormona, que al actuar sobre ellas las coloquen en igualdad o inferioridad de condiciones a las mutaciones DR.

La experiencia sin embargo, demuestra que sucede justamente lo contrario; cuando se hace crecer una mutación DR en mezcla con una raza madre normal, es ésta la que desplaza casi totalmente del medio a la citada mutación, aún cuando los factores del tipo de toxohormona producidos normalmente por dicha mutación se aumenten artificialmente. O sea, al contrario de lo que ocurre en organismos cancerosos la toxohormona no parece tener el menor efecto sobre las razas normales de microorganismos.

Existen sin embargo, algunas razas de microorganismos que espontáneamente producen un gran número de mutaciones con deficiencia respiratoria, y cuyos cultivos en medios normales, contienen a menudo un 50 por ciento de mutaciones DR. Tal es el caso de las llamadas razas inestables de levadura. Sobre una de las cuales, la $R_6 U_2$, demostraron en 1963 Callao y col. que la toxohormona ejerce un efecto tóxico, consistente en inhibir el crecimiento de dicha levadura en medios que llevan como única fuente de carbono sustancias, como el lactato, que sólo pueden ser utilizadas por vía aerobia, es decir, con intervención de la cadena transportadora de electrones.

Este hecho, demuestra que también en microorganismos la toxohormona es capaz de ejercer sobre las células normales un efecto similar al ejercido en organismos superiores con tumores en crecimiento. Si bien, por lo que parece, esta acción sólo es ejercida sobre razas genéticamente susceptibles. Este efecto de la toxohormona explica igualmente la coexistencia, e incluso preponderancia, de mutaciones DR en los cultivos normales de este tipo de levadura.

Si consideramos, de una parte, que desde antiguo se ha postulado que la susceptibilidad al cáncer va ligada en cierto modo a líneas familiares, es decir, está relacionada con la constitución genética de la raza de los organismos y que, de otra, no cabe pensar que la transformación de una célula normal en cancerosa, cualquiera que sea la causa, ocurra exclusivamente en aquellos animales que albergan tumores, podemos formular como hipótesis de trabajo que dichas mutaciones malignas sólo prosperan en aquellos casos en que las células normales que las rodean sean susceptibles a las sustancias tóxicas elaboradas a liberadas por ellas; susceptibilidad que dependerá fundamentalmente de las características genéticas del animal donde se produce la mutación.

De acuerdo con esta hipótesis, los organismos no cancerosos, lo serían no porque en ellos no se produjese la mutación cancerosa sino porque sus células al no ser sensibles a la acción de las sustancias tóxicas de que hablamos, competirían, con éxito con dicha mutación y la eliminarían.

Aplicando esta hipótesis, al mundo microbiano, la mayoría de las células normales de levaduras y bacterias, tal como confirma la experiencia, no serían sensibles a la toxohormona y otras sustancias liberadas por las mutaciones DR, y sólo en algunos casos de razas genéticamente sensibles, como la $R_6 U_2$, se daría el caso de que las mutaciones DR, equivalentes en hipótesis a las malignas, compitieran con éxito con las normales.

Una vez formulada esta hipótesis cabe plantearse el problema de si la toxohormona no actúa sobre las células de microorganismos normales, bien porque estos sean simplemente insensibles, o bien porque específicamente neutralicen o destruyan dichos factores tóxicos.

El presente trabajo ha sido proyectado para estudiar y esclarecer estos últimos puntos. Consiste fundamentalmente en determinar si la insensibilidad de las células normales de levadura a la acción de la toxohormona es innata o se debe a un proceso de neutralización o de destrucción de esta sustancia y, caso de que fuera esto último, determinar el mecanismo por el que se produce dicha neutralización, así como intentar el aislamiento de los hipotéticos factores neutralizantes y comprobar su efectividad en relación con la neutralización "in vivo" de la toxohormona.

Para la obtención de los extractos de levadura usados en nuestros ensayos, desarrollamos métodos originales.

De los resultados por nosotros obtenidos sacamos las conclusiones siguientes:

1.^a Las suspensiones de células normales de levadura —raza de *Saccharomyces cerevisiae*— poseen la capacidad de neutralizar el efecto tóxico de factores del tipo de la toxohormona cancerosa.

2.^a La neutralización de dicha toxohormona por las células de levadura normal es llevada a cabo, mediante la producción de factores termostables difusibles en el medio, que son los verdaderamente encargados de neutralizar la toxohormona, probablemente combinándose con ella.

3.^a En orden a la citada neutralización, dichos factores, necesitan del concurso de sustancias termolábiles, no difusibles, presentes en los homogenizados.

4.^a La acción de estos últimos factores, puede ser sustituida por un calentamiento a 115° de la mezcla de toxohormona y factores termostables.

5.^a Se sugiere por tanto el siguiente mecanismo de neutralización: las células de levadura normal en presencia de indicios de toxohormona que se libera de manera constante en la autólisis de las células, producen uno, o varios factores termostables difusibles que, bajo la acción de otros factores, probablemente de tipo enzimático, presentes en el interior de la célula, son capaces de unirse a la toxohormona y neutralizar sus efectos tóxicos.

6.^a De las experiencias realizadas en tejido de conejo, parece deducirse que las células normales de tejidos animales superiores, poseen un mecanismo similar de neutralización de la toxohormona.

7.^a Es posible, que los dos tipos de factores, sean específicos entre sí, de tal manera, que la toxohormona solamente es neutralizada cuando ambos son del mismo origen.

BIBLIOGRAFIA

- CALLAO, V. y MONTROYA, E. (1961).—*Science*, 134, 2.041.
 CALLAO, V., OLIVARES, J. y MONTROYA, E. (1963).—*Microbiol. Españ.* 16,91.
 CALLAO, V., OLIVARES, J. y MONTROYA, E. (1963).—*Science*, 142, 1668-69.
 DOUNCE, A. L. y SHANEWISSE, R. P. (1950).—*Cáncer Res.* 10, 103-107.
 GREENFIELD, R. E. y MEISTER, A. (1951).—*J. Nat. Cancer Inst.* 11, 997.

- GREENSTEIN, J. P. (1954).—*Biochemistry of Cancer*. Academic Press, New York.
- KAMPSCHMIDT, R. F. y SCHULTZ, G. A. (1963).—*Cáncer Res.* 23, 751-756.
- KAMPSCHMIDT, R. F. y UPCHURCH, H. F. (1963).—*Cáncer Res.* 23, 756-761.
- KATO, M., MLIKI, K., MATSUNAGA, K. y YAMAMURA, Y. (1959).—*Am. Rev. Respirat. Disca-*
ses. 80, 535-542.
- MATSUOKA, K., HOZUMI, M. y SUGIMURA, T. (1964).—*Gann*, 55, 411-421.
- MIFUCHI, I., HOSOI, M., YANAGIHARA, y NISHIDA, M. (1963). *Gann*, 54, 205.
- NAKAHARA, W. y FUKUOKA, F. (1948).—*Japan Med. J.* 1, 271.
- NAKAHARA, W. y FUKUOKA, F. (1958).—*Advan. Cáncer Res.* 5, 157-177.
- NIXON, J. C. y ZINMAN, B. (1966).—*Cáncer J. Biochem.* 44, 1069.
- OLIVARES, J., CALLAO, V. y MONTOYA, E. (1966).—*Microbiol. Españ.* 19, 249.
- OLIVARES, J., CALLAO, V. y MONTOYA, E. (1967).—*Science.* 157, 327-328.
- WARBURG, O. (1956).—*Science.* 123, 309.