

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

PAOLO MOCARELLI, GIANNI GAROTTA, CARLA PORTA,  
MARIA LUISA VILLA, ENRICO CLERICI

## **Influenza del tumore ascite di Ehrlich sulla capacità clonante del fegato fetale**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.5, p. 794–800.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_52\\_5\\_794\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_5_794_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Biologia.** — *Influenza del tumore ascite di Ehrlich sulla capacità clonante del fegato fetale* (\*). Nota di PAOLO MOCARELLI, GIANNI GAROTTA, CARLA PORTA, MARIA LUISA VILLA e ENRICO CLERICI, presentata (\*\*) dal Socio E. CIARANFI.

SUMMARY. — Female Swiss albino mice were mated with normal males. Liver cells obtained from seventeen-day pregnant mice, either normal or given i.p.  $10^7$  Ehrlich ascites carcinoma cells one week earlier, were injected i.v. into lethally  $x$ -irradiated recipients.

The spleen colonizing capacity of the "tumoral" liver was significantly decreased as compared to that of normal controls. The present data confirm our previous findings on the inhibitory effect of Ehrlich ascites carcinoma on the colony forming power of the bone marrow cells of the host. They support our working hypothesis that tumor cells produce some "soluble factor" that goes across the placenta and is capable of interfering with stem cell differentiation in to hemopoietic and lymphopoietic tissues.

Topi adulti normali inoculati intraperitonealmente (i.p.) con cellule di carcinoma ascite di Ehrlich e successivamente  $x$ -irradiati subletalmente, sviluppano un numero di colonie spleniche endogene significativamente inferiore a quello dei controlli solo  $x$ -irradiati.

Similmente se il midollo osseo di animali portatori di tumore viene iniettato endovena (i.v.) in topi  $x$ -irradiati letalmente, si osserva negli accettori un numero di colonie spleniche significativamente minore rispetto a quello dei controlli iniettati con midollo osseo normale [1].

In entrambi i casi il fenomeno dimostra una diminuita capacità proliferativa e differenziativa delle cellule staminali del midollo osseo dei portatori di tumore ed è verosimilmente attribuibile a qualche « fattore solubile » prodotto dal tumore stesso, capace di interferire con la differenziazione dei tessuti emopoietici e linfoidei.

Infatti, nel corso di precedenti ricerche, sono apparse poco probabili sia l'influenza di virus leucemogeni, che sono assenti nel nostro stipite tumorale, che la distruzione parziale del midollo osseo da parte di metastasi neoplastiche [2].

Come primo approccio per saggiare l'ipotesi del « fattore solubile » ci siamo proposti di osservare se il tumore può esercitare la sua azione inibitrice anche oltre una barriera naturale quale la placenta.

Per questo abbiamo studiato la capacità clonante del fegato di feti di diciassette giorni, prelevati da femmine portatrici di carcinoma di Ehrlich, nella presunzione che solo molecole in soluzione, ma non le cellule del tumore, possano superare la placenta.

(\*) Lavoro eseguito presso la Cattedra di Immunologia dell'Istituto di Patologia Generale dell'Università di Milano. Questo lavoro è stato svolto grazie all'aiuto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.).

(\*\*) Nella seduta del 13 maggio 1972.

Le cellule epatiche fetali, ottenute da madri normali o innestate una settimana prima con  $10^7$  cellule di carcinoma di Ehrlich, sono state iniettate nella vena caudale di topi adulti Swiss, letalmente  $x$ -irradiati (fig. 1).

L'età del feto è stata calcolata prendendo come tempo zero il giorno di formazione del tappo mucoso vaginale che si manifesta a breve distanza dalla copula e perdura 24-36 ore. L'errore dovuto all'intervallo tra copula e comparsa di tale formazione è al massimo di 12 ore.

Le cellule tumorali, lavate e risospese in soluzione fisiologica, sono state iniettate in peritoneo alle femmine gravide, al decimo giorno di gestazione, nella dose di  $10^7$  calcolata in base alle sole cellule vive, secondo il metodo dell'esclusione del colorante vitale [3].

Al diciassettesimo giorno i feti, estratti mediante taglio cesareo, venivano lavati in una capsula di Petri con PBS sterile a  $4^{\circ}\text{C}$ ; i loro fegati venivano prelevati asetticamente, raggruppati e spappolati con un pestello di vetro, attraverso un retino a sottili maglie di acciaio ( $0,1 \times 0,1$  mm).

Le cellule, sospese in TC Eagle HeLa, venivano centrifugate a 100 g per 8 minuti, risospese e poste a decantare per 20 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ , per lasciar sedimentare gli aggregati più voluminosi.

Le cellule del supernatante, lavate e contate, venivano iniettate nella vena caudale degli accettori  $x$ -irradiati nelle dosi di  $10^5$  e  $5 \times 10^5$ .

Per l'irradiazione i topi venivano posti in scatole di plastica, divise in quattro compartimenti, ognuno dei quali ospitava due animali in posizione fissa. I fattori di radiazione erano: 200 kv, 15 ma, filtro di 0,5 mm di Cu, dose al minuto 60 r, a 30 cm dalla fonte.

Le milze degli accettori venivano prelevate 10 giorni dopo l'inoculazione delle cellule epatiche e immediatamente fissate in soluzione di Bouin.

Si contavano dapprima le colonie, visibili a occhio nudo sulla superficie splenica, e successivamente si includevano le milze in paraffina per l'allestimento di preparati istologici. La distribuzione percentuale dei cloni, secondo i tipi cellulari, veniva determinata su preparati colorati con ematossilina-eosina, secondo i criteri abituali [4].

Alcuni feti per ogni esperimento venivano interamente spappolati e le cellule ottenute da ogni animale venivano iniettate in peritoneo in 2-3 accettori normali che venivano controllati per due mesi, per osservare l'eventuale comparsa di tumore ascite di Ehrlich o di altre forme neoplastiche.

Il trenta per cento delle femmine innestate con carcinoma ascite di Ehrlich al momento della laparotomia presentava feti già morti ed era perciò inutilizzabile per l'esperimento.

La mortalità degli accettori  $x$ -irradiati con 850 r entro i dieci giorni dal trasferimento delle cellule epatiche variava dal 10 al 20 per cento a seconda che il donatore provenisse da madre normale o cancerosa; quindi ogni gruppo sperimentale era composto da un numero di animali tale da permetterci di sceglierne casualmente 25 tra i sopravvissuti.

La Tabella I riporta il numero e le rispettive medie delle colonie esogene spleniche formatesi dopo l'inoculo rispettivamente di  $10^5$  e  $5 \times 10^5$  cellule

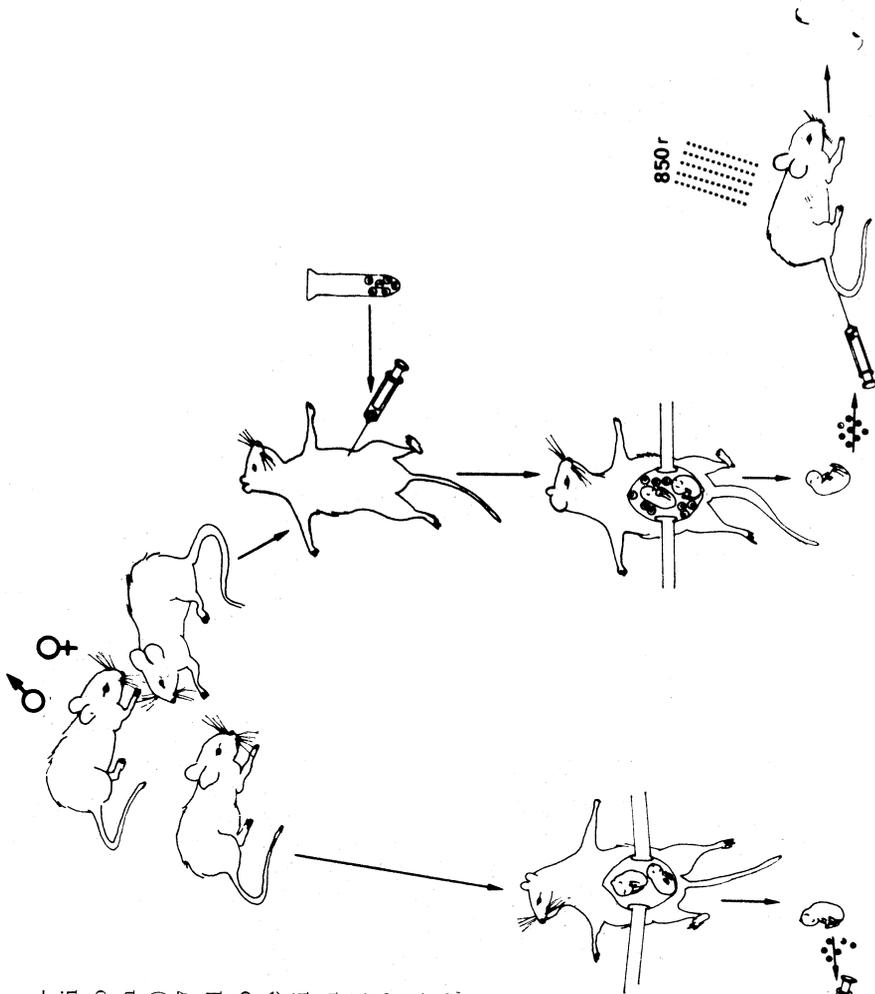


Fig. 1. - Rappresentazione schematica dell'esperimento di induzione dei cloni fetali. Topi adulti Swiss vengono accoppiati e separati subito dopo la formazione del tappo mucoso vaginale. Un gruppo di femmine gravide (colonna di destra) viene trapiantato i.p., in decima giornata, con  $10^7$  cellule di carcinoma ascite di Ehrlich, mentre il gruppo di controllo non subisce alcun trattamento (colonna di sinistra). Al diciassettesimo giorno le madri di entrambi i gruppi vengono sacrificate, i feti estratti ed i loro fegati spapolati con un pestello. Le cellule del fegato, lavate e contate, vengono iniettate i.v., nelle dosi di  $10^5$  e  $5 \times 10^5$  in accettori  $x$ -irradiati letalmente. Le milze di questi ultimi vengono prelevate 10 giorni dopo per il conteggio dei cloni.

epatiche di feti di madri cancerose e di feti di controllo della stessa età, prelevati da madri normali.

Si può osservare che, indipendentemente dalla grandezza dell'inoculo, le cellule staminali di fegato di feti di madre cancerosa generano colonie spleniche in numero palesemente minore di quello dei controlli.

TABELLA I.

*Numero e rispettive medie delle colonie spleniche ottenute da accettori x-irradiati, iniettati con cellule epatiche di feti di madre normale o tumorale.*

TESSUTO INIETTATO	Gruppo	Dose	Numero Colonie	Media $(x + 2)$	Media $\left(\frac{1}{\sqrt{x+2}}\right) \pm ES$
Fegato di fetto di madre normale	A	$10^5$	15.40.32. 9.36. 6.14. 14.23.51.37. 8.25.20. 19.18.36.21.20.59.11. 14.33.36.15.	26,48	$0,21439 \pm 0,01140$
	B	$5 \times 10^5$	40.50.30.14.40.45.22. 22.17.11.20.31.17.16. 36.33.25.45.20.33.32. 5.25.21.22.	28,88	$0,19974 \pm 0,01000$
Fegato di fetto di madre tumorale	C	$10^5$	9. 8. 5. 3. 6. 2. 4. 6. 2. 2. 5. 5. 3. 6. 7.26. 3. 4. 4. 2. 3. 8. 5.10. 6.	7,76	$0,38738 \pm 0,01516$
	D	$5 \times 10^5$	9.15. 7. 5.12. 8.18. 3.14.11. 9.11.16.15. 5.16. 8. 9. 6.11.13. 8. 5.10. 6.	12,00	$0,30203 \pm 0,01095$

Poichè i risultati non sono distribuiti normalmente, per procedere ad una loro valutazione statistica è stato necessario trasformarli usando il reciproco di  $\sqrt{x+2}$ .

Verificata l'omoscedasticità con il test di Bartlett, i dati trasformati sono stati sottoposti ad un'analisi statistica della varianza secondo i metodi di Snedecor e di Scheffè, i quali hanno evidenziato una differenza altamente significativa fra i trattamenti ( $P < 0,01$ ) come riportato nella Tabella II.

Le colonie spleniche sono state classificate come eritroidi, granuloidi, megacariocitiche, miste e indifferenziate. La distribuzione percentuale che, nel caso di genesi da cellule staminali di feti di madre cancerosa era di 50, 23, 2, 15 e 10, non si discostava significativamente da quella dei controlli.

Nessuno degli accettori normali iniettati i.p. con cellule di feti di madri tumorali, ha sviluppato, entro i due mesi di controllo, alcuna forma neoplastica.

TABELLA II.

*Analisi della varianza eseguita con i metodi di Snedecor e di Scheffè.*

I) Significatività dell'effetto della dose inoculata ( $10^5$  o  $5 \times 10^5$ ) di tessuto epatico fetale, del tipo di inoculo (proveniente da madre normale o tumorale) e dell'interazione: dose per tipo di inoculo sulla efficienza clonante delle cellule staminali del fegato fetale emopoietico. Analisi eseguita con il metodo di Snedecor.

FONTI DI VARIAZIONE	Gradi libertà	Devianza	Varianza	F	P
Effetto dose di inoculo	1	0,06249	—	16,798	< 0,01
Effetto tipo di inoculo	1	0,47362	—	127,317	< 0,01
Interazione: dose $\times$ tipo di inoculo . . . . .	1	0,03124	—	8,393	< 0,01
Variabilità fra gruppi .	3	0,56735	0,18911	50,836	< 0,01
Errore sperimentale . .	96	0,35789	0,00372	—	—

II) Differenze tra le medie dei gruppi sperimentali valutate con il metodo di Scheffè. I gruppi A, B, C, D sono quelli indicati nella Tabella I.

GRUPPO SPERIMENTALE	CONFRONTO CON I GRUPPI SPERIMENTALI	P
A	< B	< 0,05
	> C	< 0,05
	> D	< 0,05
B	> A	< 0,05
	> C	< 0,05
	> D	< 0,05
C	< A	< 0,05
	< B	< 0,05
	< D	< 0,05
D	< A	< 0,05
	< B	< 0,05
	> C	< 0,05

Il numero delle colonie esogene formatesi nella milza degli accettori irradiati letalmente ed inoculati i.v. con cellule di fegato di feto di madre cancerosa è significativamente minore di quello dei controlli inoculati i.v. con cellule di fegato di feto di madre normale. Il rapporto fra colonie originate da cellule di fegato di feto di madre normale e cancerosa è di circa 4 e 3,3 per inoculi di  $10^5$  e  $5 \times 10^5$  elementi figurati, rispettivamente. In altri termini, vi è scarsa proporzionalità fra grandezza dell'inoculo e capacità colonizzante delle cellule staminali epatiche. È verosimile che ciò sia in funzione dell'esiguità dello « spazio » splenico disponibile per l'insediamento delle cellule staminali e della limitata disponibilità di « fattori microambientali induttivi locali », capaci di stimolare la moltiplicazione e differenziazione degli elementi pluripotenti.

Ricordiamo, per analogia, che una barriera connessa con l'età e frapposta all'insediamento splenico di cellule linfoidi trasferite fra topi singenici è stata descritta da Celada, che l'ha attribuita alla materiale mancanza di spazio disponibile nella milza dell'accettore per le cellule del donatore; tuttavia tale barriera è radiosensibile [5].

I presenti dati sulla depressione della capacità colonizzatrice delle cellule di fegato di feto di madre cancerosa collimano bene con quelli già da noi ottenuti con l'impiego di midollo osseo emopoietico di animali portatori di carcinoma ascite di Ehrlich. L'attuale esperimento conferma l'esistenza di fattori solubili di origine tumorale, capaci di agire a distanza, attraversando la placenta la quale, almeno nella ipotesi di lavoro, si dovrebbe comportare come un filtro temporaneamente impermeabile alle cellule neoplastiche.

Tuttavia è noto che eritrociti, leucociti e piastrine fetali possono penetrare nel circolo materno ed anche che gli stessi elementi, nonché cellule leucemiche della madre, sono talvolta reperibili nel sangue del neonato.

Il più semplice modo di escludere che le cellule di carcinoma ascite di Ehrlich provenienti dalla cavità peritoneale materna fossero penetrate nel feto sarebbe stato quello di osservare se topi nati a termine manifestassero, con il trascorrere del tempo, l'insorgenza di tumore.

Questo tipo di indagine si è reso impossibile, perchè la dose di  $10^7$  cellule di carcinoma ascite di Ehrlich, da noi adottata, è tale che in nessun caso le femmine gravide hanno partorito feti vivi. D'altronde, la scelta di un inoculo imponente di cellule neoplastiche era stata dettata sia dalla necessità di ottenere una forte produzione del fattore solubile che da quella di disporre di un inoculo ampiamente superiore alla dose soglia di  $8,5 \times 10^5$  cellule cancerose, ossia la dose minima capace di deprimere le cellule staminali e le reazioni immunitarie dell'ospite [2]. L'ostacolo è stato aggirato inoculando i.p. in topi adulti normali delle sospensioni di cellule di fegato *in toto*, prelevate al diciassettesimo giorno di gestazione. Infatti l'aggressività del carcinoma ascite di Ehrlich e di altri carcinomi ascite, come il Krebs 2, è tale che bastano 1-4 cellule maligne per provocare la formazione di versamento neoplastico. Tuttavia nessuno degli accettori ha mostrato segni di malattia per i due mesi di osservazione, ad eccezione di occasionali, modesti versamenti ascitici flo-gistici, suscitati probabilmente da una normale reazione da allotrapianto.

Facciamo notare che le cellule di carcinoma ascite di Ehrlich, eventualmente presenti nelle sospensioni di elementi fetali superano certamente indenni la reazione da allotrapianto a causa della aspecificità del tumore.

Verificata così l'esistenza di un fattore solubile inibente la capacità colonizzatrice delle cellule staminali di fegato fetale, capace di agire indipendentemente dalle cellule cancerose che lo producono, rimane da dimostrare quale sia la sua natura e come esso agisca.

Sulla sua natura non disponiamo ancora di dati personali. Dalla letteratura si evince che numerosi fattori solubili tumorali capaci di interferire con la moltiplicazione cellulare e con la reattività immunitaria sono già stati descritti.

Ricordiamo fra i principali un polipeptide dializzabile che riduce l'indice mitotico e la crescita di colture cellulari *in vitro* [6, 7, 8, 9], la  $\alpha$ -globulina isolabile da siero di pazienti affetti da morbo di Hodgkin che inibisce la blastogenesi da fitoemagglutinina [10], l'IgG citotossica per gli immunociti [11, 12], le  $\alpha$ - e  $\beta$ - glicoproteine immuno depressive di Apfel e Peters (1967, 1968) ed il filtrato di tessuti leucemici di topo, che inibisce la capacità del siero di stimolare la formazione di colonie emopoietiche *in vitro* [13].

D'altronde sono stati descritti fattori solubili presenti nel siero di topi normali capaci, rispettivamente, di stimolare la formazione di colonie emopoietiche *in vitro* [14] e di deprimere le risposte solubili primarie e secondarie verso antigeni timo-dipendenti, ma non verso quelli timo-indipendenti.

Tenuto conto di queste osservazioni si può ipotizzare che il fattore solubile prodotto dal carcinoma ascite di Ehrlich possa agire sulle cellule staminali *direttamente* ostacolandone la differenziazione in elementi eritromieloidi ed immunocompetenti, oppure *indirettamente*, con un effetto bifasico, ossia diminuendo la produzione dei fattori solubili del siero normale che favoriscono la formazione delle colonie emopoietiche ed aumentando quella dei fattori che ostacolano l'anticorpopoiesi verso antigeni timo-dipendenti.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] P. MOCARELLI, M. L. VILLA, A. PESSINA, G. BIGI e E. CLERICI, «Atti Acc. Naz. Lincei», 49, 80 (1970).
- [2] E. CLERICI, P. MOCARELLI, M. L. VILLA e N. NATALE, «J. Nat. Cancer Inst.», 47, 555 (1971).
- [3] S. HARRIS, T. N. HARRIS e M. B. FARBER, «J. Immunol.», 72, 148 (1954).
- [4] G. GAROTTA e E. CLERICI, «Lo Sperimentale», in corso di stampa.
- [5] F. CELADA, «J. exp. Med.», 124, 1 (1966).
- [6] B. HOLMBERG, «Nature», 195, 45 (1962).
- [7] B. HOLMBERG, «Europ. J. Cancer», 4, 263 (1968).
- [8] B. HOLMBERG, «Europ. J. Cancer», 4, 271 (1968).
- [9] B. SYLVEN e B. HOLMBERG, «Europ. J. Cancer», 1, 199 (1965).
- [10] M. W. CHASE, «Cancer Res.», 26, 1097 (1966).
- [11] M. A. PIKOVSKI e Y. ZIFRONI-GALLON, «Nature», 218, 1070 (1968).
- [12] M. A. PIKOVSKI, In «Fourth annual meeting of the Israel immunological society», 9-11 april 1972, Rehovot. Abstracts of papers, p. 39.
- [13] D. METCALF e R. FOSTER, «J. Nat. Cancer Inst.», 39, 1235 (1967).
- [14] E. R. STANLEY e D. METCALF, «Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.», 47, 467 (1969).