
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

TERESA ZAVANELLA

Il melanoma del tritone crestato: stato attuale delle ricerche

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 56 (1974), n.6, p. 1031–1042.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_56_6_1031_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. — *Il melanoma del tritone crestato: stato attuale delle ricerche.* Nota di TERESA ZAVANELLA, presentata (*) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — Malignant cutaneous neoplasms arise in the newt, *Triturus cristatus* Laur., as a result of treatment with chemical carcinogens. The architecture of the tumor and features of early lesions support the idea that the tumor arises by a multicentric proliferation of the melanocyte system and can be classified as scanty pigmented melanoma, usually associated with junctional activity (Pl. I–II). Electron microscopy shows that neoplastic cells contain melanin and premelanin granules which occur in various amounts and degree of melanization (Pl. III). The DOPA-oxydase histochemical reaction varied according to individual cases, while tyrosinase reaction was negative.

The tumor has been successfully transplanted into animals of the same species and of different genus or even order, without conditioning the recipient animals. The growth rate of the tumor is greatly dependent on the environmental temperature: it is drastically retarded at 4° C, whereas massive widespread metastases develop in animals maintained at 30° C, with a survival rate of 15–20 days.

Various studies carried out in our laboratory aimed first at gaining experimental evidence of a viral etiology. Towards this end, two different experiments were devised, one consisting of the treatment of the animals with cell-free ultrafiltrates of the tumor, the other consisting of the treatment of the animals with nucleic acids extracted from the tumor; control animal were injected with preparations of normal organs.

In the 254 animals injected with ultrafiltrates a rough correlation has been observed between the incidence of the melanoma and the spreading of the tumor in the donors (Table I) (however these results must be looked at with some caution, because virus-like particles have never been found in electron microscope studies). Such a correlation has not been demonstrated in the 670 newts injected with nucleic acids; of interest is the fact that, in this experimental group, the overall incidence of melanoma was very high in animals coming from areas with high industrialization, i.e. in the newts from the environs of Pavia (54%), in comparison with the newts from Napoli (11%); the difference was highly significant ($P < 0.001$) and independent of the treatment.

As nothing is known about the natural history of the melanoma of the newt, an epidemiological study has been undertaken. We have examined 909 animals caught in minimally polluted waters of the environs of Milano (Rosate: 416 cases) and of the environs of Perugia (Bagnaia: 494 cases) in order to study the prevalence rate of the tumor in natural populations of different geographical origin. Twelve tumors (2.9%) were found in the newts collected in the neighbourhood of Rosate, while in the animals from Perugia the tumor rate was lower (0.8%). No relationship between body length and tumor rate has been observed (Table II).

Further research is envisaged to study the influence of water pollution on melanoma prevalence.

Da molti anni nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano si stanno conducendo ricerche su un tumore cutaneo maligno del tritone (*Triturus cristatus* Laur.), originariamente indotto con metilcolantrene o con benzopirene. (Leone, 1953 e 1957) [10, 11] e mantenuto poi in laboratorio mediante trapianto nella camera anteriore dell'occhio o nel connettivo sottocutaneo. Neo-

(*) Nella seduta del 29 giugno 1974.

plasie cutanee morfologicamente simili a quelle indotte con idrocarburi policiclici sono state occasionalmente osservate, da noi [13, 33] e da altri Autori [22], anche in animali non trattati.

CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE

Per quanto concerne l'istogenesi, riteniamo che il tumore in questione derivi dalle cellule pigmentate melaniche che, negli anfibi, sono situate sia nel derma superficiale che nello spessore dell'epidermide. Negli stadi iniziali il tumore appare sempre localizzato alla giunzione dermo-epidermica, in cui si osserva una tendenza dei melanofori subepidermici ad arrotondarsi ed a spostarsi verso i piani profondi del derma, perdendo progressivamente il pigmento melanico; anche nello spessore dell'epidermide le cellule pigmentate si fanno rotondeggianti, parte a citoplasma più o meno carico di pigmento, parte a citoplasma pallido, decisamente più chiaro di quello delle cellule malpighiane circostanti. Negli stadi mano a mano più avanzati si ha l'invasione del sottocute e della muscolatura da parte di infiltrati diffusi e di nidi più o meno voluminosi di cellule neoplastiche di aspetto epitelioido, modicamente polimorfe, con nuclei vescicolosi, rotondi od ovoidali, talora con invaginazioni della membrana nucleare, cromatina finemente dispersa, citoplasma pallido raramente con granuli di pigmento melanico; l'epidermide si fa in parte ipertrofica, inviando brevi o lunghi zaffi nella massa neoplastica sottostante spesso senza un limite ben definito, in parte si assottiglia e infine si ulcera estesamente. È importante sottolineare la presenza di teche intraepiteliali contenenti nidi di cellule neoplastiche e la mancanza spesso di un limite netto fra le cellule epidermiche ed il tumore, oltre che la tendenza delle cellule neoplastiche e delle cellule epidermiche stesse a migrare nel derma sottostante (quadri cosiddetti di *Abtropfung* o di «sgocciolamento»). È frequente il reperto di emboli neoplastici nei vasi sanguigni e linfatici, con localizzazione delle metastasi nei tessuti molli e in vari organi; la milza è spesso sede di metastasi anche nel caso di tumori in stadio non avanzato. Con l'impregnazione argentea i nidi tumorali appaiono pressoché privi di stroma.

In base al complesso degli aspetti sopra accennati, il tumore va a nostro avviso classificato come melanoma prevalentemente acromico, caratterizzato dalla presenza di alterazioni giunzionali (Tav. I, figg. 1 e 2; Tav. II, figg. 1 e 2).

Lo studio istochimico dell'attività tirosinasi in tumori indotti direttamente con metilcolantrene e in tumori da trapianto, ha messo in evidenza, se pur non costantemente, una reazione modicamente positiva delle cellule neoplastiche sia nelle localizzazioni primarie che nelle metastasi, usando come substrato la DOPA, mentre usando come substrato la tirosina non si osserva mai sintesi di pigmento melanico; l'epidermide normale del tritone, anche usando come substrato la tirosina, presenta invece una reazione positiva diffusa, che manca nei preparati di controllo previamente incubati con sodio-dietil-ditiocarbammato, inibitore specifico della tirosinasi.

Al microscopio elettronico sono state riscontrate, in tutti i tumori studiati, formazioni caratteristiche di dimensioni variabili da 0.2 a 1 μ , rotondeggianti od ovali, spesso a biscotto, circondate da una membrana e con una matrice omogenea o finemente granulare; la densità elettronica della matrice è estremamente variabile ed occasionalmente si riscontrano strutture lamellari simili a quelle presenti negli organuli delle cellule pigmentate normali e neoplastiche di altri vertebrati: tali formazioni, interpretabili come melanosomi e premelanosomi (Tav. III), presentano talora reazione positiva in seguito a incubazione con DOPA [5, 34].

VELOCITÀ DI CRESCITA DEL TUMORE

Le modalità di crescita del melanoma del tritone sono simili a quelle di un altro tumore degli anfibi, l'adenocarcinoma renale della *Rana pipiens*: è noto che il carcinoma di Lucké [14] cresce rapidamente nei mesi estivi, mentre a bassa temperatura resta quiescente e compaiono, nelle cellule neoplastiche, particelle virali tipo herpes [8, 21], ritenute l'agente causale del tumore in questione [19, 23]. Un'analoga relazione fra stagione e velocità di crescita dei trapianti di tumore si osserva anche nel tritone [13, 33].

Per meglio caratterizzare questo comportamento si è studiata la velocità di crescita dei trapianti in condizioni estreme di temperatura (2° C e 30° C) in tritoni inoculati con sospensioni di cellule tumorali nel sottocute: si è visto così che a 30° C il tumore cresce rapidamente ulcerandosi in media dopo 9 giorni e portando l'animale all'exitus dopo 15-20 giorni, mentre alla temperatura di 2° C l'accrescimento dell'innesto si arresta, anche se gli animali vengono trasferiti a bassa temperatura con tumori già in stadio avanzato (nell'epidermide e nel tessuto mielopoietico le mitosi sono invece presenti anche dopo prolungata permanenza a 2° C).

È interessante rilevare che in una serie di animali posti dapprima a 2° C per un tempo variabile da 15 a 277 giorni e successivamente trasferiti a 30° C, si è osservata, a 30° C, una sopravvivenza significativamente maggiore nei gruppi di animali tenuti per lungo tempo a bassa temperatura, rispetto a quelli tenuti a 2° C per tempi brevi o messi direttamente a 30° C. Tali esperimenti sono stati condotti su una serie di 75 animali, inoculati tutti con la stessa preparazione di cellule tumorali e divisi in lotti di 15 animali ciascuno, messi a 30° C direttamente o dopo permanenza a 2° C per 15-61-182 e 277 giorni.

L'esame al microscopio elettronico di alcuni casi di tumore tenuti a bassa temperatura non ha tuttavia messo in evidenza la presenza di particelle virali né in cellule neoplastiche apparentemente vitali, né in cellule neoplastiche in stato più o meno avanzato di lisi, pur essendo stati studiati anche tumori di animali tenuti a bassa temperatura per quasi cinque mesi, cioè per un periodo di tempo che, nel caso del carcinoma di Lucké consente la completa espressione del genoma virale e la replicazione del virus.

TRAPIANTABILITÀ

Il melanoma del tritone è facilmente trapiantabile oltre che in animali della stessa specie, anche in anfibi di specie diversa, senza ricorrere a trattamenti condizionanti; sono stati infatti effettuati con successo trapianti in urodeli del genere *Pleurodeles* ed in anfibi anuri [11, 12]. Particolarmente interessanti a questo riguardo sono le modificazioni morfologiche delle cellule neoplastiche nel passaggio dal tritone allo *Xenopus laevis*, nonché nel passaggio inverso: le cellule neoplastiche hanno infatti le dimensioni proprie delle cellule della specie in cui vengono trapiantate, voluminose nel tritone, piccole e con nucleo spesso nucleolato nello *Xenopus*. Questo cambiamento della morfologia delle cellule tumorali, riportato oltre che da noi [12] da altri Autori [2], può essere dovuto semplicemente al diverso ambiente in cui vengono a trovarsi le cellule trapiantate nei due diversi ospiti (basti pensare alla diversa morfologia che può assumere un tumore nello stesso individuo, in rapporto alla localizzazione), oppure può essere spiegato ammettendo che il frammento innestato regredisca, liberando un agente presumibilmente virale, responsabile della cancerizzazione dei tessuti dell'ospite.

Questa seconda ipotesi, che ci ha spinto a intraprendere una serie di indagini volte a dimostrare una possibile etiologia virale del melanoma del tritone, non ci sembra tuttavia accettabile, dato il precoce attecchimento del tumore in alcuni casi; recentemente in uno *Xenopus* vennero riscontrate piccole metastasi nel fegato e nella milza già 8 giorni dopo il trapianto ed attorno all'innesto vi era un diffuso infiltrato di cellule neoplastiche di dimensioni variabili, con forme di transizione fra piccole cellule « tipo *Xenopus* » e cellule grandi « tipo tritone ». Dato il breve lasso di tempo, ci sembra più attendibile la prima ipotesi sopra formulata.

Si deve quindi ammettere che il grado di malignità del tumore sia tale da consentire un superamento delle barriere immunologiche anche in ospiti appartenenti a specie molto lontane, ovvero che queste barriere siano, negli anfibi, poco perfezionate [6]; tale superamento può forse essere favorito dall'impiego, per il trapianto del tumore, di frammenti di milza metastatica e dall'innesto quindi di un certo numero di cellule spleniche immunologicamente competenti, che potrebbero accelerare l'attecchimento. Per verificare tale ipotesi, stiamo attualmente portando avanti una serie di ricerche volte anzitutto a caratterizzare il comportamento di allotrapianti e di eterotrapianti di milza normale, sempre usando come donatori e come ospiti il tritone e lo *Xenopus* [20].

TENTATIVI DI TRASMISSIONE DEL MELANOMA CON PREPARATI ACELLULARI

Nel tentativo di mettere in evidenza l'eventuale implicazione di un virus nella genesi del melanoma del tritone, sono stati seguiti due diversi indirizzi sperimentali, uno basato sul trattamento degli animali con filtrati acellulari

di tumori o con omogenati di tumori conservati a bassa temperatura per vario tempo, l'altro basato sul trattamento degli animali con preparazioni di acidi nucleici estratti dal tumore, poiché è noto che da alcune neoplasie a sicura etiologia virale sono estraibili acidi nucleici ad attività oncogena, mentre non sembra che ciò sia possibile con tumori a genesi apparentemente non virale [3].

Per queste prove sulla filtrabilità e sulla trasmissibilità mediante preparazioni di acidi nucleici, sono sempre stati impiegati tumori da trapianto (dal 5° al 15° passaggio), in modo da essere sicuri di non avere tracce di idrocarburi policiclici nelle preparazioni inoculate negli animali.

TRATTAMENTO DEGLI ANIMALI CON ACIDI NUCLEICI

Negli esperimenti con gli acidi nucleici (AN) sono stati impiegati diversi metodi di estrazione del DNA, dell'RNA e delle ribonucleoproteine (4,26-32,35) e sono stati trattati complessivamente 670 animali, parte dei quali vennero inoculati con preparazioni di AN o di RNP estratti dal melanoma (324 casi), parte con preparazioni ottenute da organi normali di tritone (269 casi), parte con AN eterologhi del commercio o semplicemente con soluzioni saline (77 casi). Altri 204 animali hanno ricevuto l'innesto di tumore o di frammenti di organi normali dagli stessi donatori usati per la preparazione degli AN, mentre 60 non hanno subito alcun trattamento.

Nel corso di queste esperienze è stata osservata una notevole variabilità dei risultati, ottenendosi talora un'elevata incidenza di tumori, altre volte un risultato completamente negativo, pur cercando di mantenere il più possibile costanti le condizioni sperimentali. Va inoltre rilevato che in gran parte degli esperimenti il procedimento di estrazione degli AN dagli organi di donatori normali e dagli organi di animali portatori di tumore è stato condotto in parallelo, in modo da ridurre al minimo l'interferenza di eventuali variazioni sperimentali: anche in queste prove in parallelo si è talora riscontrata una frequenza di tumori maggiore negli animali trattati con AN di tumore rispetto a quelli trattati con AN normali, ma in altri esperimenti l'incidenza era uguale nei due gruppi o addirittura maggiore negli animali di controllo inoculati con AN estratti da organi normali.

Considerando la totalità della casistica, non si è messa in evidenza una differenza di risposta al trattamento con AN di tumore e di organi normali, o con AN eterologhi; va inoltre detto che sono stati osservati casi di tumore, sempre con incidenze simili, anche in animali inoculati con le stesse preparazioni di AN previamente incubate con nucleasi (DNasi o RNasi) e che in un gruppo di 12 animali di controllo trattati con soluzione tampone di fosfati (PBS) vi erano ben 6 casi di tumore.

Ai fini degli scopi che ci eravamo proposti è comunque interessante sottolineare che in una serie di esperimenti condotti su animali provenienti dai dintorni di Napoli, l'incidenza del melanoma è risultata maggiore dopo trattamento con AN di tumore (18 casi su 60) rispetto al trattamento con AN

normali (5 casi su 56): la differenza è tuttavia scarsamente significativa ($P < 0.05$) e l'incidenza non era correlabile al tempo intercorso dal trattamento, né al grado di diffusione della neoplasia nei donatori. Anche in questa serie si sono inoltre osservati tumori in animali trattati con preparazioni incubate con nucleasi.

Nel complesso i risultati ottenuti non consentono quindi di trarre delle conclusioni circa un'eventuale genesi virale del melanoma del tritone, almeno sulla base della sua trasmissibilità mediante preparazione di acidi nucleici.

Il dato di maggior rilievo emerso nel corso di queste esperienze è invece la elevatissima frequenza dei tumori (54%) negli animali provenienti dai dintorni di Pavia, anche se trattati semplicemente con PBS, notevolmente più alta di quella osservata nei tritoni provenienti da Napoli (11%), cioè indipendentemente dal tipo di trattamento subito: all'analisi statistica la differenza fra i due gruppi è altamente significativa ($P < 0.001$) [35].

Tale reperto pone evidentemente tutta una nuova serie di interrogativi circa la natura dei diversi fattori, genetici, climatici e ambientali di vario genere, che possono essere alla base di queste differenze. Poiché i tritoni provenienti da Pavia, secondo quanto riferito dal fornitore, erano stati catturati nella zona del Lambro meridionale, cioè in acque ad elevato indice di inquinamento [15], non è da escludere che la maggiore industrializzazione della Lombardia, nonché il largo impiego di pesticidi nella pianura padana, possano giocare un ruolo non secondario nella diversa incidenza dei tumori osservata negli animali presi in considerazione, ma solo una ricerca a carattere epidemiologico può dare una risposta a questi interrogativi.

TRATTAMENTO DEGLI ANIMALI CON FILTRATI ACELLULARI

Le ricerche sulla filtrabilità del tumore sono state condotte su un totale di 254 animali adulti, inoculati in parte con filtrati di tumore, in parte con filtrati di organi normali; altri 159 animali sono stati trattati con omogenati o hanno ricevuto l'innesto di tumore o di frammenti di organi normali, partendo dagli stessi donatori usati per la preparazione dei filtrati.

Nel corso di questa ricerca, di cui sono stati pubblicati solo alcuni risultati preliminari [24], sono stati allestiti 49 filtrati: in alcuni esperimenti gli omogenati erano preparati in NaCl isotonico o in liquido di Tyrode e, previa centrifugazione, vennero filtrati a temperatura ambiente o a 10°C, ma in gran parte degli esperimenti tutto il procedimento di preparazione del filtrato era condotto a 4°C, usando per l'omogenato una soluzione tampone di citrato (tampone di Clark), cui veniva aggiunta ialuronidasi per favorire il successivo processo di filtrazione; dopo centrifugazione il soprannatante era filtrato sotto pressione su membrane Millipore (con pori per lo più del diam. di 150-250 m μ), di cui si controllava l'integrità facendo successivamente passare una brodcoltura di *E. Coli* [24].

I risultati ottenuti sono piuttosto variabili da esperimento a esperimento, ma in linea di massima si è osservata una certa corrispondenza tra il grado di diffusione della neoplasia negli animali usati come donatori e l'incidenza dei tumori negli animali trattati. Partendo da donatori con tumore in stadio avanzato sono stati allestiti 26 filtrati, 14 dei quali si sono rivelati attivi, inducendo il tumore in 39 casi su 82, mentre con gli altri 12 filtrati nessuno dei 54 animali trattati sviluppò il tumore: complessivamente quindi l'incidenza del melanoma in questo gruppo di animali è stata del 28.7 % (39 casi su 136). In una altra serie di esperimenti, partendo da animali con tumore scarsamente diffuso, si ottennero solo 5 filtrati attivi su 13 e l'incidenza complessiva del tumore negli animali trattati è stata intorno al 12 % (9 casi su 76). Con altri 10 filtrati infine, preparati da donatori normali e da donatori che all'accertamento istologico risultarono completamente privi di tumore, non si osservò alcun caso di melanoma fra i 42 animali trattati (Tabella I).

TABELLA I

Trattamento con filtrati acellulari di melanoma.

Entità del tumore nei donatori	N. filtrati saggiati	N. animali trattati	N. animali con tumore (%)
++	14 attivi	82	39 (47.6 %)
	12 inattivi	54	0
	totale . . .	136	39 (28.7 %)
±	5 attivi	41	9 (21.9 %)
	8 inattivi	35	0
	totale . . .	76	9 (11.8 %)
Normali	10 inattivi	42	0

All'analisi statistica la differenza di incidenza del melanoma nei tre gruppi sopra considerati è risultata altamente significativa ($P < 0.01$). Sembra quindi che almeno alcuni melanomi del tritone siano filtrabili, anche se l'incidenza complessiva non è stata particolarmente elevata (nei trapianti e nei trattamenti con omogenati l'incidenza del tumore nei tre gruppi è stata rispettivamente del 92 %, del 68 % e del 25 %). Questi risultati sono tuttavia da interpretare con molta cautela, in quanto i filtrati preparati da donatori normali e da donatori portatori di tumore sono stati allestiti in epoche diverse e non si è tenuto conto della provenienza degli animali, fattore questo che, da quanto emerso nelle ricerche con gli acidi nucleici, può influire notevolmente sull'esito degli esperimenti.

Elevate percentuali di attecchimento, fino al 100 % in alcuni lotti, sono state invece ottenute in una serie di animali inoculati con omogenati di tumori

conservati per diverso tempo a bassa temperatura (2°C e -20°C), in soluzione fisiologica o in glicerina a varia concentrazione [25].

Sono attualmente in corso anche ricerche collaterali in cui l'attività degli omogenati di tumore viene saggiata su cellule coltivate *in vitro* (colture monolayer di fibroblasti di embrione di pollo e di cellule renali di tritone adulto).

ASPETTI EPIDEMIOLOGICI

Il rilievo di una diversa incidenza di tumori in rapporto alla provenienza geografica, occasionalmente emerso nel corso degli esperimenti con gli acidi nucleici, ci ha indotto a intraprendere una vasta indagine a carattere epidemiologico volta a studiare la prevalenza del melanoma del tritone crestato in popolazioni naturali. I soli dati della letteratura sulla epidemiologia dei tumori degli anfibi sono quelli relativi al carcinoma di Lucké della rana [16-18].

Non è escluso che le differenze regionali siano in rapporto ad una base genetica, vari Autori ritengono infatti che i melanomi siano tumori sotto il controllo genetico in varie specie animali; basti pensare ai melanomi indotti combinando determinati fattori ereditari di due specie di pesci, lo *Xiphophorus helleri* e il *Platypoecilus maculatus* [1]. Può tuttavia essere determinante anche l'intervento di fattori extra-genetici, quali una diversa esposizione ad agenti etiologici di natura chimica (pesticidi o altre sostanze inquinanti) [18], di natura fisica (intensità delle radiazioni solari) [9] o magari virale [7].

Ci siamo proposti di articolare la nostra indagine in modo da ottenere informazioni oltre che sulla suscettibilità al melanoma di popolazioni provenienti da diverse regioni italiane, anche sull'influenza che possono avere altri fattori, quali la stagione e il grado di inquinamento delle acque. Per quanto concerne la distribuzione geografica è evidente che il confronto è valido solo se gli animali vengono catturati in acque pulite nello stesso periodo dell'anno, mentre per lo studio delle fluttuazioni stagionali gli animali devono appartenere alla stessa popolazione, in modo da non avere l'interferenza di altri fattori; anche per valutare l'influenza del grado di inquinamento delle acque sulla prevalenza del melanoma è necessario che le popolazioni siano il più possibile omogenee, è necessario cioè studiare campioni di animali della stessa regione, catturati nello stesso periodo dell'anno in acque a diverso indice di inquinamento.

Attualmente abbiamo preso in considerazione solo i primi due problemi (distribuzione geografica e fluttuazioni stagionali) e verranno qui riferiti i dati relativi a 901 animali, dei quali 493 sono stati catturati nei dintorni di Perugia (zona di Bagnaia) e 416 nei dintorni di Milano: per la Lombardia abbiamo scelto una zona agricola (Rosate) con canali di irrigazione derivati dal Naviglio Grande, che, secondo di dati di Marchetti [15] è caratterizzato da un indice

di inquinamento molto basso, comunque decisamente minore di quello delle altre acque della provincia di Milano.

Gli animali di Rosate sono stati catturati tutti in primavera, nella seconda quindicina di marzo e nella prima quindicina di aprile degli anni 1970 (221 casi) e 1971 (195 casi), mentre gli animali di Perugia sono stati catturati in stagioni diversi: 87 casi nel luglio del 1969, 306 casi alla fine di dicembre dello stesso anno, 100 casi nell'aprile del 1970 (fig. 1).

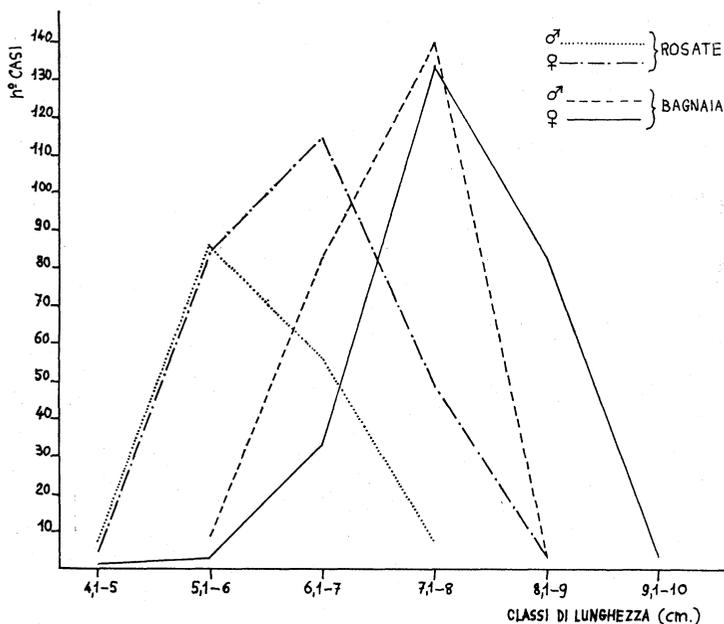


Fig. 1. - Poligoni di frequenza della lunghezza dei tritoni catturati nei dintorni di Rosate (Milano) e di Bagnaia (Perugia).

Tutti gli animali sono stati esaminati istologicamente, in quanto i tumori di piccole dimensioni possono essere ricoperti da cute integra e sfuggono quindi al solo esame macroscopico; il prelievo della pelle è stato sempre fatto nella medesima zona (regione scapolare) oltre che in corrispondenza di eventuali lesioni cutanee macroscopicamente rilevabili; venivano inoltre prelevati vari organi (milza, fegato, cuore, gonadi e corpi grassi annessi) e si procedeva all'allestimento dei preparati istologici effettuando sezioni a diversi livelli: per ogni animale sono state esaminate circa 50 sezioni. I risultati di questa ricerca non sono ancora stati pubblicati, in quanto sono stati riscontrati alcuni casi di difficile interpretazione che necessitano un ulteriore accertamento istologico.

Nella serie di 416 animali di Rosate è stato riscontrato un elevato numero di casi di tumore (12 casi, pari al 2,9% dei tritoni esaminati), senza un preciso rapporto con le dimensioni corporee (distanza bocca-limite caudale della cloaca). Nessuna differenza è stata riscontrata fra i lotti catturati nella

primavera del 1970 (6 casi su 221) e quelli catturati nello stesso periodo del 1971 (6 casi su 195).

Nella serie di 493 animali di Perugia sono stati osservati 4 casi di tumore, pari al 0.8 %: un caso fra gli 87 animali catturati nel mese di luglio, tre casi fra i 306 animali catturati alla fine di dicembre dello stesso anno; questi ultimi tuttavia appartenevano a un lotto di 110 tritoni messi per un mese alla temperatura di 30°C allo scopo di favorire la crescita di eventuali piccoli tumori preesistenti a renderne così più agevole il reperto; poiché tutti e tre gli animali vennero a morte per effetto dello shock termico, la diagnosi di tumore non venne posta con sicurezza in quanto l'unico organo apparentemente interessato dalla neoplasia era la milza, che appariva in cattivo stato di conservazione. Nessun tumore è stato osservato nel gruppo di 100 animali catturati in primavera. Non sembra quindi che vi siano differenze stagionali nella serie di tritoni di Perugia, ma il basso numero di tumori riscontrati non consente di trarre conclusioni definitive in merito a questo problema.

TABELLA II

Prevalenza del melanoma del tritone crestato in rapporto alla provenienza e alle dimensioni dell'animale (distanza bocca-limite caudale cloaca) (909 casi) ().*

Classi di lunghezza (cm)		4,1- 5,0	5,1- 6,0	6,1- 7,0	7,1- 8,0	8,1- 9,0	9,1- 10,0	Totale (%)
ROSATE (Milano)	femmine	0/5	0/85	5/115	1/49	0/4	—	6/258 (2,33%)
	maschi	0/7	3/86	3/56	0/9	—	—	6/158 (3,8c%)
BAGNAIA (Perugia)	femmine	0/1	0/3	0/33	2/134	0/83	0/4	2/258 (0,77%)
	maschi	—	0/9	0/83	2/140	0/3	—	2/235 (0,85%)

(*) I dati riportati nella Tabella si riferiscono al numero di casi di tumore (numeratore) rispetto al numero di casi esaminati (denominatore).

Per quanto concerne le differenze regionali, si osserva nel complesso una più alta prevalenza del melanoma negli animali di Rosate rispetto a quelli catturati nei dintorni di Perugia (Tabella II): all'analisi statistica la differenza è risultata significativa prendendo come limite il livello del 5 % (χ^2); escludendo però i tre casi incerti di Perugia, la differenza fra i due gruppi diventa altamente significativa ($P < 0.01$). Resta da vedere se ciò è imputabile a una diversa suscettibilità genetica delle due popolazioni prese in considerazione o se possono essere in gioco altri fattori, quali ad esempio un più largo impiego di pesticidi nella zona di Rosate.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Dal complesso delle ricerche finora svolte non si possono certamente trarre conclusioni definitive in merito ai diversi problemi affrontati, ma sono emersi alcuni dati che possono costituire il punto di partenza per ulteriori indagini.

Per quanto riguarda il problema dell'etiologia virale del tumore studiato, i risultati finora ottenuti sono stati in gran parte deludenti, purtuttavia l'elevata incidenza del melanoma osservata in alcuni esperimenti fa sospettare l'esistenza di un agente infettante. Sarebbe anzitutto opportuno ripetere le esperienze sulla filtrabilità con popolazioni di tritoni caratterizzate da una bassa incidenza spontanea di tumori, inoculando i filtrati in esemplari non ancora metamorfosati e, in particolare, facendo il confronto tra filtrabilità di tumori tenuti a temperatura ambiente e quella di tumori prelevati ad animali tenuti a bassa temperatura per un certo tempo.

In un altro indirizzo di ricerche, si potrebbe utilizzare il tritone crestato come animale test per individuare fra le diverse sostanze inquinanti, di origine industriale, domestico o agricolo, quelle potenzialmente dotate di attività oncogena: ciò richiede evidentemente la collaborazione di diversi laboratori di ricerca.

Per quanto ci concerne, abbiamo in programma di continuare le indagini già iniziate sull'epidemiologia del melanoma del tritone in popolazioni naturali, in rapporto all'inquinamento delle acque.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ANDERS F. (1967) - « *Experientia* », 23, 1-10.
- [2] BALLS M. (1963) - « *Rev. Suisse Zool.* », 70, 237-244.
- [3] BHARGAVA P. M. e SHANMUGAM G. (1971) - « *Progr. Nucleic Acid Res.* », 11, 103-192.
- [4] CAMERINI E. e ZAVANELLA T. (1968) - « *Il Cancro* », 21, 379-394.
- [5] CERESA CASTELLANI L. e ZAVANELLA T. (1965) - « *Atti del V Congresso Italiano di Microscopia elettronica* », Bologna 5-7 ottobre, 62-65.
- [6] COHEN N. (1971) - « *Am. Zool.* », 11, 193-205.
- [7] EPSTEIN W. L., FUKUIYAMA K., BENN M., KESTON A. S. e BRANDT R. B. (1968) - « *Nature* », 219, 979-980.
- [8] FAWCETT D. W. (1956) - « *J. Bioph. Biochem. Cytol.* », 2, 725-742.
- [9] LEE J. A. H. e MERRILL J. M. (1970) - « *Med. J. Austr.* », 2, 846-851.
- [10] LEONE V. (1953) - « *Tumori* », 39, 420-442.
- [11] LEONE V. (1957) - « *Ist. Lomb. Sci. Lett. (Rend. Cl. Sci.)* », 92, 220-240.
- [12] LEONE V. e ZAVANELLA T. (1964) - « *Tumori* », 50, 39-63.
- [13] LEONE V. e ZAVANELLA T. (1969) - « *Recent Results in Cancer Res.* », M. Mizell Ed., Springer-Verlag, New York, 184-194.
- [14] LUCKÉ B. (1934) - « *Am. J. Cancer* », 20, 352-379.
- [15] MARCHETTI R. (1968) - « *Acqua e Aria* », 1, 15-57.
- [16] MCKINNELL R. G. e MCKINNELL B. K. (1968) - « *Cancer Res.* », 28, 440-444.
- [17] MCKINNELL R. G. (1969) - « *Recent Results in Cancer Res.* », M. Mizell Ed., Springer-Verlag, New York, 254-260.

- [18] MCKINNEL R. G. e DUPLANTIER D. P. (1970) - «Cancer Res.», 30, 2730-2735.
 [19] NAEGELE R. F., GRANOFF A. e DARLINGTON R. W. (1974) - «Proc. Nat. Acad. Sci.», 71, 830-834.
 [20] PACCES ZAFFARONI N. e ZAVANELLA T. (1972) - «Boll. Zool.», 39, 645-646.
 [21] RAFFERTY K. A. JR. (1964) - «Cancer Res.», 24, 169-185.
 [22] SEILERN-ASPANG F., WIESER W. e WEISSBERG M. (1966) - «Arch. f. Geschwulstsch.», 201-228.
 [23] TWEDELL K. S. (1967) - «Cancer Res.», 27, 2042-2052.
 [24] ZAVANELLA T. (1964) - «Tumori», 50, 485-498.
 [25] ZAVANELLA T. (1964) - «Atti Soc. It. Cancerol., III Congresso Naz.», Roma, 6-8 novembre, 5, 416.
 [26] ZAVANELLA T. (1965) - «IX Congresso Soc. It. Patol., Torino-Saint Vincent, 10-12 giugno», 875-879.
 [27] ZAVANELLA T. e CAMERINI E. (1965-66) - «Boll. Soc. It. Patol.», 9, 210-213.
 [28] ZAVANELLA T. e PROTTI NECCHI M. (1967) - «Il Cancro», 20, 171-191.
 [29] ZAVANELLA T., CAMERINI E. e LEONE V. (1967) - «Boll. Zool.», 34, 180.
 [30] ZAVANELLA T., CAMERINI E. e LEONE V. (1967) - «Folia Hered. et Patol.», 16, 195-202.
 [31] ZAVANELLA T., CAMERINI E. e CAPPANNINI R. (1968) - «Il Cancro», 21, 477-496.
 [32] ZAVANELLA T., CAMERINI E. e CAPPANNINI R. (1968) - «Il Cancro», 21, 497-510.
 [33] ZAVANELLA T. e LEONE V. (1968) - «Atti Accad. Med. Lomb.», 23, 45-53.
 [34] ZAVANELLA T. e CERESA CASTELLANI L. (1968) - «Boll. Zool.», 35, 393.
 [35] ZAVANELLA T. e CAMERINI E. (1964) - In corso di stampa sulla rivista «Tumori».

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I

- Fig. 1. - *Tritone n. 2152*: trattamento con filtrati acellulari, uccisione dopo 4 mesi. Focolai di melanoma nell'arto anteriore, a distanza dal trattamento: si notano le cellule pigmentate rotondeggianti nel derma e nel sottocute. Emallume di Mayer-eosina (160×).
- Fig. 2. - Lo stesso caso della fig. 1. Invasione dei piani profondi; a destra in alto (freccia) è presente un nido di cellule neoplastiche nel contesto dell'epidermide (130×).

TAVOLA II

- Fig. 1. - *Tritone n. 2197*: trattamento con filtrati acellulari, uccisione dopo 4 mesi. Esteso focolaio di melanoma in corrispondenza dell'apice della mascella, a distanza dal trattamento. Epidermide molto assottigliata e non ben delimitabile dalla sottostante massa neoplastica. Emallume di Mayer-eosina (320×).
- Fig. 2. - *Tritone n. 3334*: trapianto di tumore nel sottocute, uccisione dopo 45 giorni. Metastasi splenica. Emallume di Mayer-eosina (220×).

TAVOLA III

- Tritone n. 821*: trapianto di tumore nella camera anteriore dell'occhio, uccisione dopo un mese. Metastasi nei corpi grassi annessi alle gonadi. Si osservano numerosi premetastasi di diverse dimensioni (freccie) (70.000×).

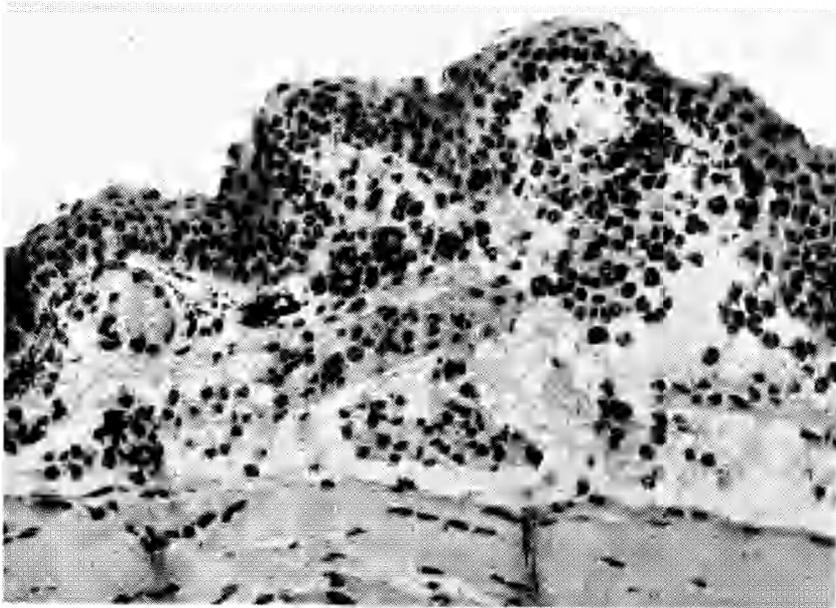


Fig. 1.

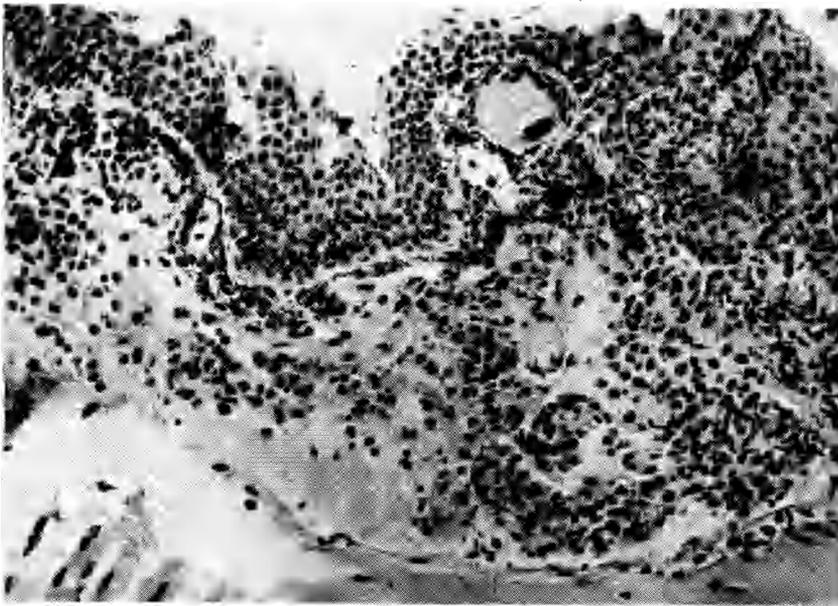


Fig. 2.

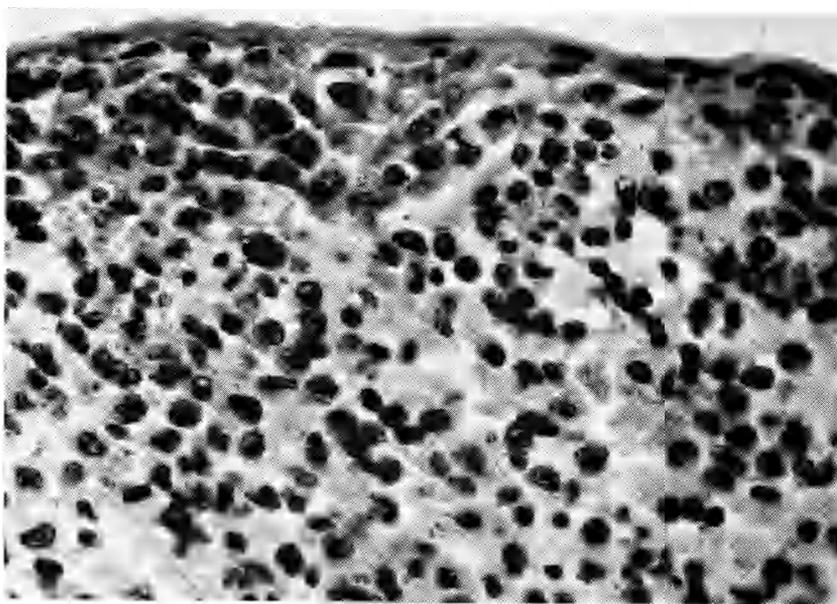


Fig. 1.

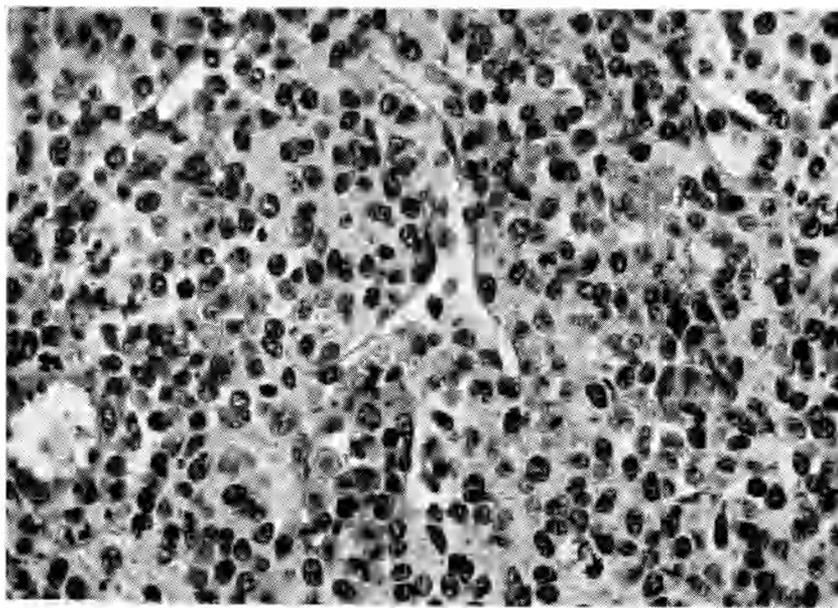


Fig. 2.

