
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ENRICO CLERICI, WALTER PIERPAOLI, MARIO ROMUSSI

Rapporti fra tolleranza immunologica alla caseina ed amiloidosi sperimentale

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.5, p. 715–722.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_5_715_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. — *Rapporti fra tolleranza immunologica alla caseina ed amiloidosi sperimentale.* Nota (*) di ENRICO CLERICI, WALTER PIERPAOLI e MARIO ROMUSSI (**) presentata (***) dal Corrisp. E. CIARRANFI.

La patogenesi dell'amiloidosi, un processo morboso abitualmente considerato di natura degenerativa o conseguenza di una alterazione del metabolismo, è tutt'ora sconosciuta.

Fra le varie ipotesi fino ad oggi formulate quella immunitaria [1-8], che considera l'amiloide come il prodotto di una reazione antigene-anticorpo, dispone, a nostro parere, dell'avallo del maggior numero di dati di fatto e sperimentali.

Ci riferiamo in particolare al ben documentato accumulo di plasmacellule e di altre cellule mesenchimali pironinofile produttrici di anticorpi, nei focolai di lesione; alla frequente associazione della amiloidosi secondaria e sperimentale con iperglobulinemia, alla dimostrazione che la concentrazione della gamma-globuline seriche declina in concomitanza con l'inizio della deposizione di amiloide nei tessuti ed alla presenza in essa, immunoistochimicamente dimostrabile, di elevate quantità di gamma-globuline. Per altri minori, ma non meno significativi dettagli, rimandiamo ad alcune rassegne su questo soggetto comparse in altra sede [9-14].

Ammettendo, come ipotesi, la esattezza della teoria immunitaria, ne consegue, come tesi, che iniettando un animale, durante la vita intrauterina o immediatamente dopo la nascita, con caseina, uno degli agenti amiloidogeni più comunemente usati, in modo da renderlo immunologicamente tollerante verso la proteina eterogenea, tale animale dovrebbe perdere la capacità di produrre anticorpi specifici alla successiva e ripetuta inoculazione della fosfoproteina e quindi non dovrebbe essere più in grado di dare origine alla deposizione intratissutale di sostanza amiloide.

La dimostrazione della validità di questo asserto è naturalmente condizionata dalla possibilità di rendere tolleranti alla caseina alcune specie amiloidogenetiche di animali di laboratorio.

Le specie differiscono infatti ampiamente per quanto riguarda la suscettibilità alla induzione della tolleranza per esposizione ad un determinato antigene in periodo peri-natale [15] ed inoltre non ci è noto alcun riferimento bibliografico sulla eventuale capacità della caseina, e cioè di un antigene non vivente - « non replicantesi » - [15] di reprimere le abituali manifestazioni di risposta immunitaria nei vertebrati.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Patologia Generale della Università di Milano

(**) Reparto Radiologico, Clinica S. Ambrogio, Milano.

(***) Nella seduta del 9 maggio 1964.

Per eseguire questo esperimento abbiamo usato un ceppo «inbred» di topi albinici Swiss allevati nel nostro laboratorio. Tre femmine, accoppiate con un maschio, venivano separate da esso e poste in gabbie isolate non appena si rendeva manifesto lo stato di gravidanza. Le gabbie venivano controllate tre volte al giorno in modo da poter stabilire con la massima esattezza il momento del parto. Entro le otto ore dalla nascita, ogni neonato delle covate prescelte veniva inoculato sottocute con 0,1 ml di una soluzione di caseina al 10% in idrato di Na e K 0,25%, sterilizzata a vapore fluente per 30 min in due successive riprese a distanza di 24 ore.

L'iniezione veniva eseguita asetticamente, usando una siringa da tubercolina munita di ago ipodermico N° 20. L'ago veniva inserito nella regione dorsale, il più caudalmente possibile e forzato cranialmente fino alla regione interscapolare a livello della quale veniva iniettata la soluzione di antigene mentre un assistente eseguiva un delicato massaggio locale. Seguendo questo metodo, solo una trascurabile quantità della soluzione veniva persa attraverso il tragitto dell'ago.

Il trattamento veniva ripetuto per sei giorni consecutivi; una ulteriore iniezione veniva eseguita il sedicesimo giorno dalla nascita. Gli animali venivano quindi svezzati in venticinquesima giornata.

Alcune covate di topi normali, nati contemporaneamente agli animali così trattati, venivano usate per gli esperimenti di controllo.

Dieci giorni dopo lo svezzamento, tutti gli animali trattati e di controllo venivano sensibilizzati alla caseina iniettando sottocute, nella regione interscapolare, 0,2 ml di una emulsione in parti uguali della soluzione di antigene e di adiuvante di Freund completo. Dopo sette giorni gli animali venivano reinoculati nella stessa sede con 0,1 ml della soluzione di antigene senza adiuvante di Freund completo.

La risposta immunitaria veniva controllata seguendo la degradazione dell'antigene marcato con I^{131} come suggerito da Talmage *et alii* [16]. Abbiamo proceduto alla iodazione della caseina seguendo, nelle linee generali, lo schema proposto da McFarlane [17]: la caseina- I^{131} veniva liberata dall'eccesso di I^{131} per passaggio attraverso una colonna di Amberlite IR 4 B, preparata come suggerito dallo stesso McFarlane [18]; una quota a parte della soluzione ottenuta veniva addizionata di acido tricloroacetico alla concentrazione finale dell'1%. In tal modo, il 98% circa della radioattività veniva ritrovata nel precipitato proteico. Dopo sette giorni dalla seconda iniezione sensibilizzante, periodo durante il quale i topi avevano bevuto acqua contenente KI 0,5% per limitare al massimo l'assorbimento tiroideo di I^{131} , ogni animale veniva iniettato, endovena, con circa μg 100 di caseina- I^{131} con una attività specifica di μC 10/mg. La radioattività dell'intero animale veniva misurata immediatamente dopo l'iniezione dell'antigene (caseina- I^{131}) con un apposito scintillatore a cristallo di NaI. La misura veniva ripetuta ad intervalli di 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 ore. Prima di ogni conteggio, la vescica veniva svuotata per compressione esterna. La radioattività residua veniva corretta per il decadimento dell'isotopo e veniva espressa come percentuale dell'atti-

vità iniziale. Durante tutto l'esperimento ogni animale veniva collocato in apposite gabbie di plastica munite di doppio fondo per evitare l'autocontaminazione con le deiezioni.

Al termine dell'esperimento tutti i topi tolleranti e di controllo sottoposti al test di degradazione dell'antigene, unitamente ad altri, venivano utilizzati per l'induzione dell'amiloidosi. A tal fine venivano praticate giornalmente, per periodi varianti da due a sei mesi, iniezioni sottocutanee di ml. 0,5 della soluzione al 10% di caseina in idrato di Na e K; ogni quattro giorni ciascun animale riceveva anche 400 U. I. di penicillina sodica per prevenire le infezioni secondarie.

Ad intervalli di 15 giorni, alcuni animali tolleranti e di controllo venivano sacrificati; la milza, il fegato e i reni venivano prelevati, fissati e colorati con i metodi P.A.S., dell'Alcian bleu, del violetto di metile, del Rosso Congo e dell'ematosilina-eosina.

Negli animali così trattati è stato ripetuto lo studio della degradazione dell'antigene dopo un mese e dopo tre mesi dall'inizio del ciclo di iniezioni amiloidogene.

All'inizio dell'esperimento abbiamo incontrato una certa difficoltà nel mantenere in vita i topi neonati trattati con caseina. Curiosamente, la mortalità variava dal 100% di alcune covate al 10% di altre. L'ostacolo è stato presto superato non appena ci siamo resi conto della riluttanza di alcune femmine ad allattare i neonati disinfettati con alcool; è stato sufficiente sostituire questo antisettico con un comune detergente cationico battericida, inodore, per contenere subito la mortalità entro il limite inferiore.

Prima di procedere allo studio della degradazione della caseina- I^{131} è stato necessario controllare se il procedimento di iodazione non ne aveva alterato le caratteristiche antigeniche. A tal fine sono state eseguite delle reazioni di agglutinazione indiretta usando emazie di montone formolate secondo Csizmas [19], tannate e sensibilizzate con caseina- I^{131} come suggerito da Stavitsky [20] e siero di coniglio immunizzato con caseina dello stesso tipo di quella utilizzata per la iodazione. I risultati, nettamente positivi (titolo 1:640), hanno dimostrato la identità immunologica della caseina normale con quella radioattiva.

La velocità di eliminazione della caseina- I^{131} è stata diagrammata in un sistema di coordinate cartesiane ponendo sulle ordinate il logaritmo della percentuale di caseina- I^{131} ritenuta nel corpo dell'animale ai tempi presi in considerazione, indicati a loro volta in ascissa (fig. 1).

La fig. 1 mostra i dati ottenuti da topi normali e da topi normali o immunologicamente tolleranti alla caseina trattati con caseina più adiuvante di Freund completo.

Negli animali normali la proteina viene eliminata a velocità elevata seguendo un andamento multiesponenziale; in queste condizioni il tempo di dimezzamento biologico dell'antigene iodato è di circa 4,30 ore, e cioè assai più breve di quello ottenuto con altre proteine iodate artificialmente, comune-

mente usate per indurre la tolleranza immunologica in topi. Ci riferiamo soprattutto alla albumina- I^{131} che in questo animale ha un tempo di dimezzamento biologico di 18 ore [21] e che viene eliminata seguendo un andamento esponenziale.

Negli animali sensibilizzati alla caseina la degradazione dell'antigene segue un andamento assai più rapido; la differenza di velocità rispetto alla curva normale è messa in evidenza anche dal calcolo dell'ADAR (antigen degraded et the accelerated rate) [21]. La ADAR ad ogni tempo è la differenza

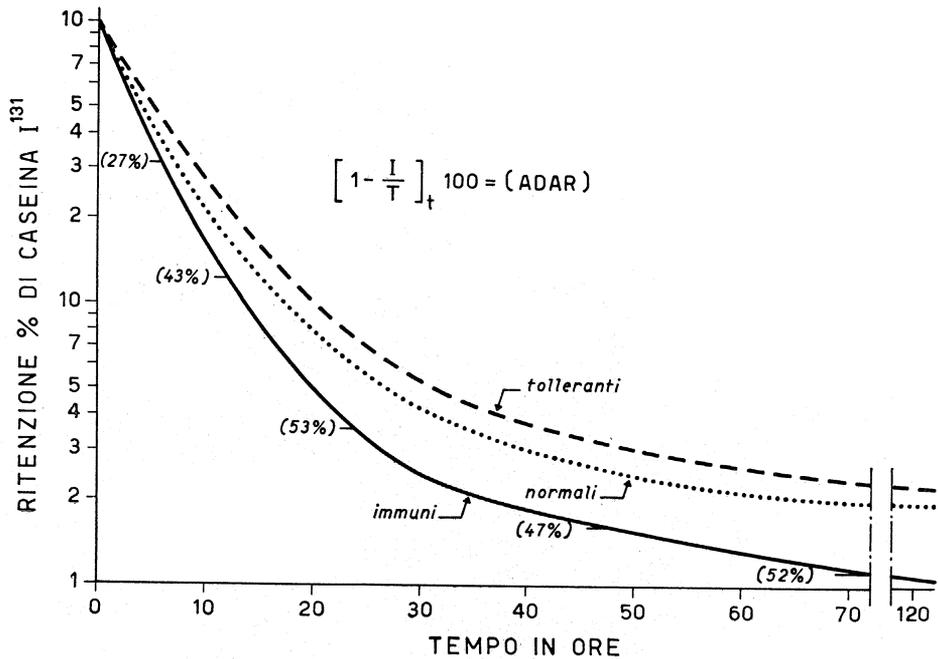


Fig. 1. - Curve di eliminazione della caseina- I^{131} iniettata in vena, ottenute da topi normali e da topi immunologicamente tolleranti e di controllo trattati per via sottocutanea con l'antigene più adiuvante di Freund completo. Fra parentesi sono riportate le ADAR riferite ad alcuni tempi sperimentali. Ulteriori dettagli nel testo.

fra l'antigene residuo nel topo normale e in quello sensibilizzato espresso come percentuale del normale; nella fig. 1 i valori dell'ADAR (calcolati in questo caso tra topi immuni e tolleranti alla caseina) sono riportati fra parentesi.

La curva di eliminazione della caseina- I^{131} negli animali trattati con l'antigene nel periodo peri-natale segue un andamento quasi sovrapponibile a quello degli animali normali: ciò indica che non si è avuta formazione di anticorpi contro la caseina e che è stato perciò possibile indurre uno stato di tolleranza immunologica alla caseina come auspicato nella ipotesi di lavoro.

Va fatto notare che le curve di eliminazione dell'antigene negli animali normali e sensibilizzati con caseina non si discostano in maniera così drammatica come nel caso degli animali trattati con albumine o globuline seriche [21-22].

L'interpretazione di questo fenomeno è abbastanza semplice; è infatti intuitivo che la già rapida eliminazione della caseina dai topi normali rende più difficile ottenere, per via immunitaria, un'ulteriore sensibile accelerazione della curva di degradazione.

Questa ipotesi è d'altra parte convalidata da Dietrich e Weigle [22], i quali non furono in grado di applicare la tecnica di degradazione dell'antigene in topi resi tolleranti alla emocianina estratta da un mollusco gasteropodo perché questa cuproproteina viene normalmente eliminata a velocità estremamente elevata. Vale qui la pena di sottolineare che non sembra esservi rapporto tra grandezza molecolare delle proteine e la loro velocità catabolica; infatti l'albumina che ha un peso medio di circa 70.000 viene degradata assai più lentamente della caseina secondo Hammarsten, da noi usata, che ha un peso molecolare di circa 371.000 e delle emocianine, il cui peso molecolare varia da un minimo di 350.000 (aragosta) a più di 5.000.000 (Elix pomatia [23]).

La tecnica di degradazione dell'antigene come misura specifica dell'immunità è stato resa necessaria dalla incapacità di altre metodiche immunologiche (ring-test; tecnica di Ouchterlony [24]; anafilassi sistemica; metodo di Farr [25]; immunoelettroforesi; emoagglutinazione indiretta, compresa la variante di Mathews [26] del test antiglobulinico per emazie tannate e, nel nostro caso, sensibilizzate con caseina) di mettere in evidenza in modo soddisfacente la presenza nel topo, che è un cattivo produttore di anticorpi precipitanti, di anticorpi anti-caseina. D'altronde la scelta del topo è stata dettata dalla necessità di disporre con facilità di un elevato numero di animali omogenei suscettibili sia alla induzione della tolleranza immunologica alla caseina che dell'amiloidosi. Desideriamo tuttavia far notare che esperimenti preliminari attualmente in corso nel nostro Istituto dimostrano che impiegando la tecnica di Munoz e di Anacker [27-28] di immunizzazione del topo per via intraperitoneale, è possibile raccogliere una forte quantità di liquido ascitico ad elevato titolo di anticorpi contro la caseina e confermare, per mezzo di comuni tecniche di precipitazione e di agglutinazione indiretta, i risultati degli esperimenti di degradazione dell'antigene iodato.

L'esame istologico degli organi prelevati dai topi ad intervalli regolari, ha dimostrato che non esiste sensibile differenza fra animali normali e immunologicamente tolleranti alla caseina per quanto si riferisce alla deposizione intratissutale di sostanza amiloide.

I tempi e la distribuzione topografica della proteina anomala sono del tutto sovrapponibili a quelli minuziosamente descritti da altri Autori, fra cui ricordiamo Kuczynski [29-30], Letterer [1-10], Favilli [13] e Puccinelli [14], Battaglia [12] e Cessi [31], ai quali rimandiamo, limitandoci in questa sede a riportare, a scopo di confronto, alcune microfotografie di milze

amiloidotiche prelevate da animali appartenenti ai due gruppi sperimentali dopo 20 e 30 giorni di trattamento (fig. 2).

Nel tentativo di studiare la durata della tolleranza, alcuni animali, non precedentemente iniettati con caseina- I^{131} , sono stati sottoposti al test di eliminazione dell'antigene 30 giorni e 90 giorni dopo l'inizio dell'esperimento. La somministrazione parenterale di caseina veniva sospesa 7 giorni prima del test; in tale periodo i topi bevevano acqua contenente KI 0,5 %.

In corrispondenza del primo termine i risultati erano immutati rispetto a quelli riportati nella fig. 1, confermando quindi il mantenimento dello stato

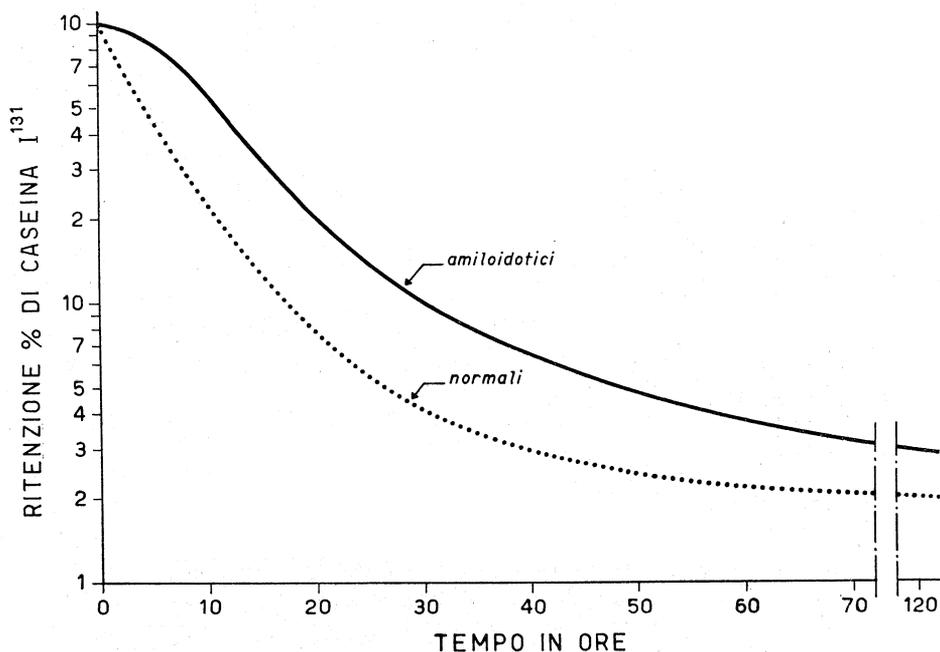


Fig. 3. - Curve di eliminazione della caseina- I^{131} iniettata in vena, ottenute da topi (già immunologicamente tolleranti e di controllo) portatori di amiloidosi di notevole grado e, per confronto, da topi normali. I topi amiloidotici erano stati sottoposti per tre mesi ad iniezioni giornaliere di caseinato di Na e K. I risultati ottenuti negli animali trattati con caseina sono stati mediati tra loro e riprodotti in una unica curva in quanto non significativamente differenti.

di tolleranza; invece, in corrispondenza del secondo termine, le curve di eliminazione dell'antigene nelle due situazioni sperimentali risultavano assai più lente di quelle dei controlli e sovrapponibili, come riportato nella fig. 3. Questo risultato può significare: 1° che parte della caseina- I^{131} iniettata in vena precipita immediatamente nella amiloide preformata ove viene tenacemente trattenuta, oppure 2° che l'eliminazione dell'antigene iodato viene rallentata dal sopravvenire di una nefrosclerosi secondaria (fig. 4).

La prima delle due ipotesi sembra la meno probabile, anche se non si può escludere che possa coesistere con la seconda; ricordiamo infatti che anche

Aronson e Dixon [32] hanno osservato in conigli portatori di amiloidosi sperimentale una significativa diminuzione del periodo di dimezzamento biologico di gamma-globuline radioattive iniettate, attribuendo il fenomeno ad un loro sequestro dal circolo nella sostanza amiloide.

I risultati di queste ricerche concludono quindi in favore della possibilità di rendere i topi immunologicamente tolleranti ad un antigene « non vivente » del tipo della caseina e contro la teoria immunitaria della genesi della amiloidosi.

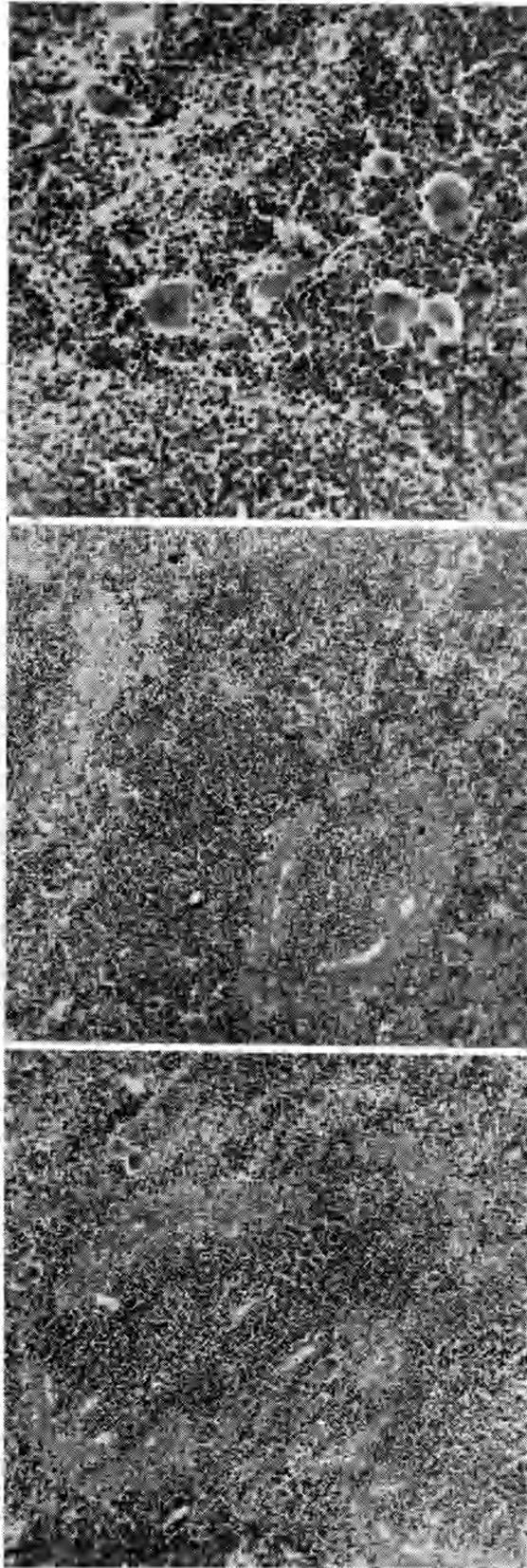
Non è tuttavia ancora possibile escludere che l'amiloidosi possa avere una origine auto-immunitaria, quale quella proposta da Pavlikhina e Serov [33] secondo i quali la somministrazione ad un animale di elevate dosi di proteine eterogenee per via parenterale induce, a livello del reticolo endotelio, trasformazioni delle cellule tali da favorire la produzione di proteine anomale agenti come auto-antigeni. Di conseguenza, la produzione di amiloide con un meccanismo immunitario potrebbe aver luogo anche in un animale immunologicamente tollerante alla caseina.

Su una base auto-immunitaria potrebbero infine venire interpretate le deposizioni di amiloide secondarie alla introduzione parenterale di sostanze prive di natura antigene [34-35-36].

BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. LETTERER, « Beitr. path. Anat. allg. Path. », 75, 486 (1926).
- [2] H. LOESCHKE, Ibidem, 77, 231 (1927).
- [3] E. LETTERER, « J. Path. Bact. », 61, 496 (1949).
- [4] S. KOLETSKY, R. M. STECHER, « Arch. Path. », 27, 267 (1939).
- [5] J. LATVALAHTI, « Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. », 93, 81 (1952).
- [6] W. H. MATHEWS, « Am. J. Med. Sc. », 228, 317 (1954).
- [7] I. V. DAVYDOVSKII, citato da [33].
- [8] J. J. VAZQUES, F. J. DIXON, « J. Expl. Med. », 104, 727 (1956).
- [9] G. TEILUM, in: *Connective Tissue in Health and Diseases*, p. 197, G. Asboe-Hansen (ed.), Munksgaard, Copenhagen (1954).
- [10] E. LETTERER, « Arch. De Vecchi Anat. Pat. », 31, 303 (1960).
- [11] H. E. CHRISTENSEN, Thesis, Copenhagen (1963). Da « *Excepta Medica* », 16, 507 (1963).
- [12] S. BATTAGLIA, « Atti Soc. It. Patologia », 7, (parte 1^a), 89 (1961).
- [13] G. FAVILLI, « Lo Sperimentale », 82, 741 (1928).
- [14] E. PUCCINELLI, « Atti Soc. Toscana Sci. Nat., in Pisa », 38, 89 (1927).
- [15] R. T. SMITH, « Adv. Immunology », 1, 67 (1961).
- [16] D. W. TALMAGE, F. J. DIXON, S. C. BUKANTZ, G. J. DAMMIN, « J. Immunol », 67, 243 (1951).
- [17] A. S. MCFARLANE, « Nature », 182, 53 (1958).
- [18] A. S. MCFARLANE, « Biochemical J. », 62, 143 (1956).
- [19] L. CSIZMAS, « Proc. Soc. Expl. Biol. Med. », 103, 157 (1960).
- [20] A. B. STAVITSKY, « J. Immunol. », 72, 360 (1954).
- [21] G. TERRES, W. WOLINS, « J. Immunol. », 83, 9 (1959).
- [22] F. M. DIETRICH, W. O. WEIGLE, « J. Exptl. Med. », 117, 621 (1963).
- [23] C. R. DAWSON, M. F. MALLETT, « Adv. Protein Chemistry », 2, 179 (1945).
- [24] O. OUCHTERLONY, « Acta Path. Microbiol. Scand. », 26, 507 (1949).

- [25] R. S. FARR, « J. Infectious Diseases », 103, 239 (1958).
- [26] K. P. MATHEWS, « J. Immunol. », 82, 279 (1959).
- [27] J. MUNOZ, « Proc. Soc. Expl. Biol. Med. », 95, 757 (1957).
- [28] R. L. ANACKER, J. MUNOZ, « J. Immunol. », 87, 426 (1961).
- [29] M. H. KUCZYNSKI, « Arch. Path. Anat. », 239, 185 (1922).
- [30] M. H. KUCZYNSKI, « Klin. Wochenschr. », 2, 2193 (1923).
- [31] C. CESSI, « Atti Soc. It. Patologia », 7, (parte I^a), 185 (1961).
- [32] S. ARONSON, F. J. DIXON, citato da [8].
- [33] L. V. PAVLIKHINA, V. V. SEROV, « Federation Proc. », 22, T 531 (1963).
- [34] D. L. PARSONS, « J. Path. Bact. », 57, 18 (1945).
- [35] C. CESSI, F. SERAFINI-CESSI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 35, 1149 (1959).
- [36] M. FUJIWARA, « J. Osaka Cy. Med. Centre », 9, 1065 (1960).



A. B. C. - Infiltrazione pericellulare di amiloide nella milza di topo immunologicamente tollerante verso la caseina (A) e di topo di controllo (B), dopo 30 giorni di trattamento con la proteina. Alcian blute, $\times 105$.
Intensa proliferazione di cellule giganti multinucleate ed iniziale deposizione di amiloide in topi immunologicamente tolleranti verso la caseina, dopo 20 giorni di trattamento con la proteina (C). Ematossilina-eosina, $\times 220$.

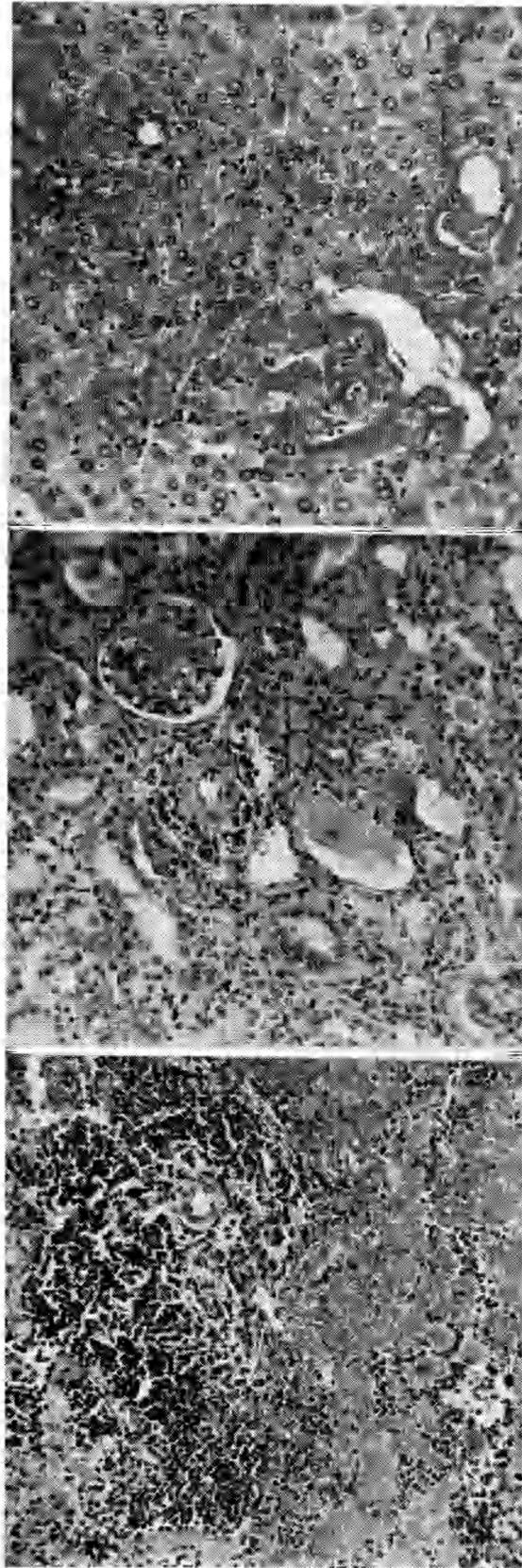


Fig. 4 A, B, C. Grave amiloidosi splenica, A), renale B) ed epatica (C) in topi immunologicamente tolleranti verso la caseina e di controllo, trattati con la proteina per 90 giorni. Osservare in (B) la deposizione di amiloide nelle anse glomerulari e nelle arteriole del polo vascolare e la obliterazione oppure dilatazione cistica dei tubuli renali adiacenti. Alcian blue, $\times 220$.