
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PAOLO MOCARELLI, MARIA LUISA VILLA, AUGUSTO
PESSINA, GIUSEPPE BIGI, ENRICO CLERICI

Meccanismi cellulari della immunodepressione da tumore

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 49 (1970), n.6, p. 446–451.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_6_446_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_6_446_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. — *Meccanismi cellulari della immunodepressione da tumore* (*). Nota di PAOLO MOCARELLI, MARIA LUISA VILLA, AUGUSTO PESSINA, GIUSEPPE BIGI e ENRICO CLERICI, presentata (***) dal Socio E. CIARANFI.

SUMMARY. — Adult mice grafted i.p. with Ehrlich ascites-carcinoma cells and then exposed to sublethal X-irradiation developed a significantly smaller number of « endogenous » spleen colonies than X-irradiated controls not grafted with tumor cells.

Similar results were obtained when bone marrow cells from tumor bearing mice were injected i.v. into lethally X-irradiated mice, so as to produce « exogenous » spleen colonies.

In both experiments, the Ehrlich ascites-carcinoma inoculum necessary to reduce significantly the frequency of hemopoietic stem cells was found equal to $8,5 \times 10^5$ cells. This is the number of tumor cells which inhibits the immune reactivity of host mice [1]. These findings are consistent with our working hypothesis that the immunological hyporeactivity of tumor-bearing animals is mediated through a functional defect of primitive bone marrow cells. Such a mechanism of action, similar to that recently proposed by Bennet and Steeves [14] for Friend leukemia virus and by Rowland and Hurd [15] for a chemical carcinogen (dimethylbenzanthracene), may point to a common pathway for the immunosuppression caused by malignant tumors.

Topi iniettati intraperitonealmente con dosi scalari di carcinoma ascite di Ehrlich mostrano una progressiva deficienza delle risposte immunitarie [1]. Dodici giorni dopo l'iniezione della dose soglia di $8,5 \times 10^5$ cellule tumorali gli animali diventano incapaci di sostenere una risposta primaria alle emazie di montone, misurata con i metodi delle aree di lisi [2] e della emoagglutinazione.

L'immunodepressione da tumore ascite di Ehrlich è paragonabile a quella osservata in topi e ratti infettati con virus leucemogeni (Friend, Rauscher e Moloney) [3, 4, 5] o portatori di tumori indotti da agenti chimici [6, 7] o ancora a quella rilevata in pazienti affetti da leucemia, linfomi o altri tumori [8, 9].

Il meccanismo che provoca questo fenomeno è ignoto, ma è probabile che i tumori inattivino o distruggano le cellule immunocompetenti o i loro precursori.

Secondo le più recenti acquisizioni [10, 11] il midollo osseo è la sorgente ultima non solo delle cellule della serie eritroide e granulosa, ma anche di tutte le cellule immunocompetenti; da questa sede infatti originano i progenitori dei linfociti che popolano gli organi linfatici centrali e periferici. Le cellule staminali migrerebbero dal midollo, attraverso il torrente circolatorio, in determinate sedi, od organi linfatici primari, come il timo e la borsa di

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

Questo lavoro è stato eseguito grazie all'aiuto finanziario del Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.).

(**) Nella seduta del 12 dicembre 1970.

Fabrizio od i suoi equivalenti poco noti dei mammiferi. Qui i precursori si differenziano in linfociti, detti rispettivamente T (o timo-dipendenti) e B (o timo-indipendenti), che popolano in seguito le aree paracorticali e follicolari degli organi linfatici secondari.

I due tipi di linfociti B e T sono entrambi indispensabili alle risposte immunitarie; essi coopererebbero infatti nel riconoscimento dell'antigene e la menomazione di una delle due popolazioni provoca profonde carenze della reattività immunologica, soprattutto umorale.

Il ruolo centrale del midollo osseo come sorgente delle cellule immunocompetenti ci ha indotti ad esaminare la capacità proliferativa, come primo tentativo di analisi della immunodepressione da tumore ascite di Ehrlich.

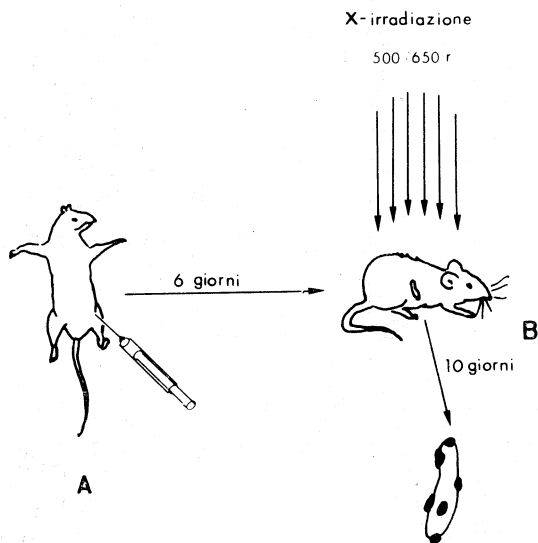


Fig. 1 a. - Cloni endogeni.

I topi, inoculati con dosi scalari di cellule di carcinoma ascite (A), vengono X-irradiati dopo 6 giorni con 500-650 r (B) e sacrificati dopo altri 10 giorni per il conteggio delle colonie sulla superficie della milza.

Abbiamo perciò applicato la tecnica della *clonazione* [12] ritenendo che una riduzione della capacità di produrre cloni emopoietici, da parte del midollo osseo di topi cancerosi, sarebbe indice di un difetto a carico delle cellule staminali, difetto che coinvolge verosimilmente i progenitori comuni di tutte le serie di elementi di origine midollare, ossia degli eritrociti, dei granulociti e dei linfociti.

Abbiamo eseguito due serie di esperimenti, la prima per stabilire la capacità dei topi cancerosi, X-irradiati subletalmente, di ricolonizzare la propria milza, producendo *cloni endogeni*; la seconda per saggiare la possibilità che il midollo degli animali portatori dello stesso tumore ripopolino la milza di accettori non cancerosi, X-irradiati letalmente, dando origine a *cloni esogeni*.

Topi maschi di ceppo Swiss, outbred, di 12 settimane di età sono stati iniettati con dosi scalari di cellule di carcinoma ascite di Ehrlich, provenienti da inoculi vecchi di sette giorni, lavate due volte e risospese in PBS, ossia

in soluzione fisiologica tamponata a pH 7,3 (NaCl 0,15 M - tampone fosfati 0,01 M pH 7,3). Le dosi erano comprese tra 1×10^5 e 1×10^7 e venivano iniettate in peritoneo.

Per lo studio dei cloni endogeni due gruppi di topi sono stati irradiati, dopo 6 giorni dall'inoculo tumorale, con 500 e 650 r. Dieci giorni più tardi essi sono stati sacrificati per dissanguamento e si è proceduto alla conta dei noduli macroscopicamente visibili sulla milza.

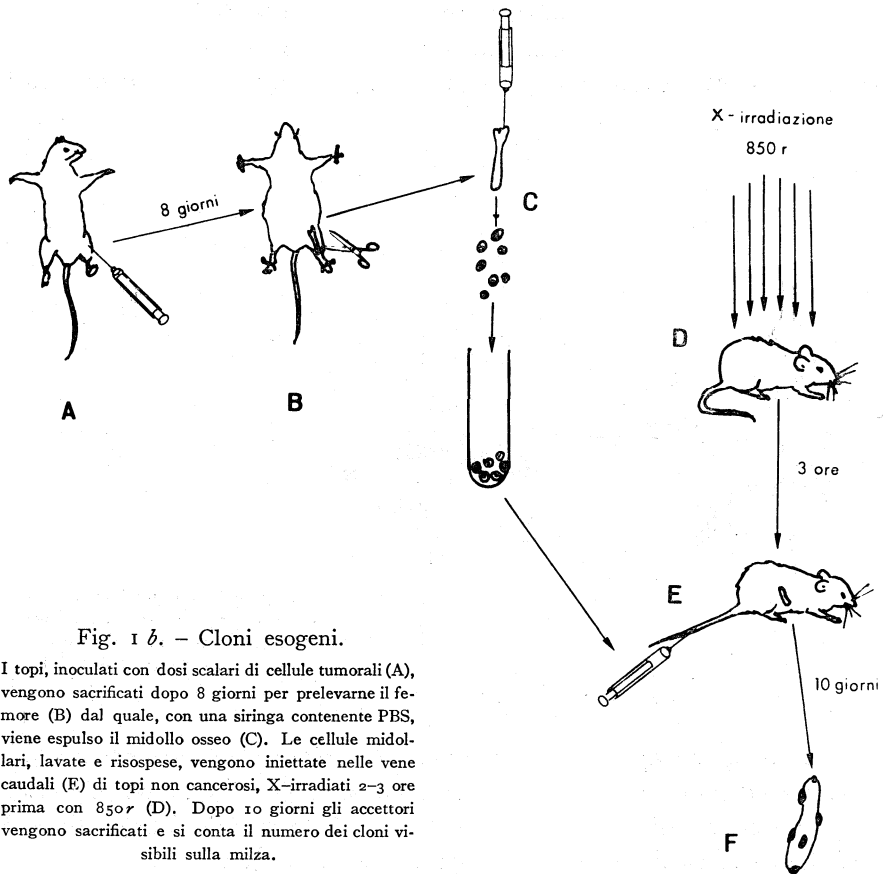


Fig. 1 b. - Cloni esogeni.

I topi, inoculati con dosi scalari di cellule tumorali (A), vengono sacrificati dopo 8 giorni per prelevare il femore (B) dal quale, con una siringa contenente PBS, viene espulso il midollo osseo (C). Le cellule midollari, lavate e risospese, vengono iniettate nelle vene caudali (E) di topi non cancerosi, X-irradiati 2-3 ore prima con 850 r (D). Dopo 10 giorni gli accettori vengono sacrificati e si conta il numero dei cloni visibili sulla milza.

Per lo studio dei cloni esogeni, topi da utilizzarsi come donatori di midollo osseo sono stati sacrificati 8 giorni dopo l'inoculo tumorale ed il midollo dei femori e delle tibie è stato espulso per pressione idrostatica dalla cavità diafisaria, iniettando PBS fredda attraverso un ago del n. 25 montato su una comune siringa. Le cellule midollari, lavate tre volte in PBS, filtrate attraverso rete di nylon e risospese alla concentrazione di 8×10^4 ml sono state iniettate per via endovenosa, nella dose di 4×10^4 in topi non cancerosi, panirradiati tre ore prima con 850 r. Dieci giorni più tardi gli animali sono stati sacrificati e sono stati contati i noduli splenici come nel caso precedente. Lo schema degli esperimenti è riassunto nella fig. 1 a, b.

Sono stati eseguiti, con tecnica convenzionale, controlli istologici delle milze portatrici di cloni; le colonie sono state classificate come eritroidi, granuloidi (neutrofile ed eosinofile), megacariocitiche, miste o indifferenziate. Sono stati anche seguiti mielogrammi sulle cellule midollari di alcuni topi portatori di tumore.

I risultati ottenuti per i cloni endogeni sono riferiti nella fig. 2 a e quelli per i cloni esogeni nella fig. 2 b. In entrambi i casi si è osservata una netta diminuzione del numero di colonie spleniche nei topi inoculati con dosi di cellule tumorali uguali o superiori a 8.5×10^5 mentre la somministrazione

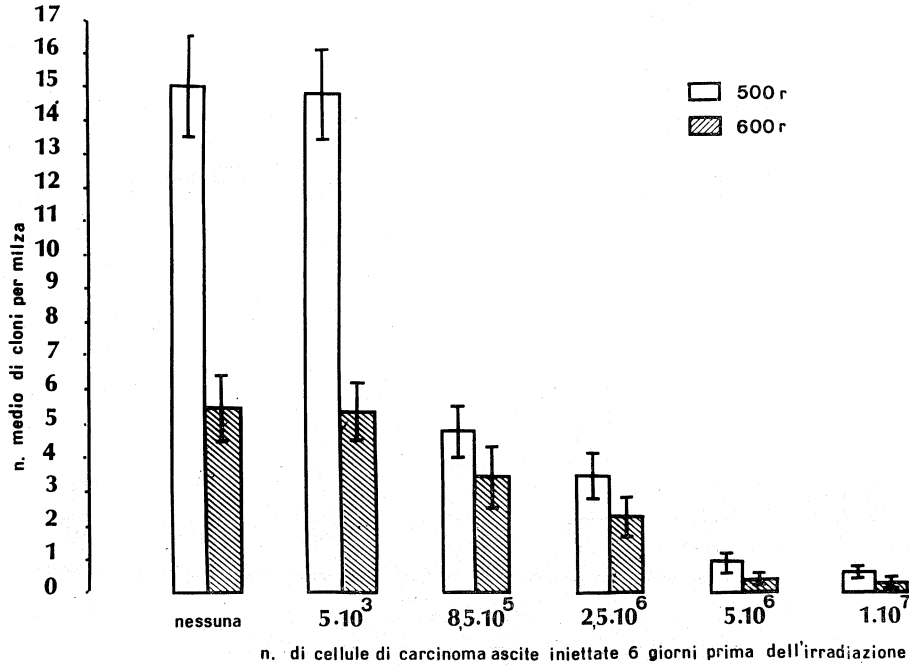


Fig. 2 a. - Cloni endogeni.

Il numero di cloni, che si formano nella milza dopo X-irradiazione con 500 o 650 r, diminuisce in modo significativo nei topi inoculati, 6 giorni prima della irradiazione, con dosi di cellule tumorali uguali o superiori a 8.5×10^5 . Gli animali di controllo sono solo X-irradiati con 500 o 650 r. Ogni valore è la media di 20 osservazioni \pm E.S.

di dosi inferiori (5×10^3) non provoca alcuna riduzione del numero di colonie visibili sulla superficie della milza.

Le colonie endogene ed esogene sono in ogni caso rappresentate da elementi della serie rossa per circa il 50 %, di quella bianca per circa il 30 % e di quella megacariocitica per circa l'1 %; le restanti colonie sono di tipo misto o indifferenziato. La distribuzione osservata è simile a quella riscontrabile nei controlli.

Il contenuto cellulare del midollo dei topi cancerizzati con 8×10^5 o più cellule tumorali è apparso ridotto a valori oscillanti tra il 20 ed il 40 % di quello dei controlli. Sono soprattutto diminuite le forme blastiche e quelle della serie eritroide, mentre la serie granulocitaria è relativamente intatta.

Non abbiamo mai osservato cellule tumorali negli strisci di midollo né abbiamo potuto riprodurre la neoplasia con inoculi anche rilevanti (5×10^6 cellule per topo) di cellule midollari di topo canceroso introdotte nel peritoneo di topi normali.

I nostri risultati indicano che il tumore ascite di Ehrlich interferisce con la capacità del midollo di ricolonizzare i tessuti emopoietici, o riducendo il numero o danneggiando le cellule staminali. Il fenomeno non è dovuto ad invasione e distruzione del midollo osseo da parte del tumore, poiché cellule tumorali non sono state riscontrate da noi in questa sede. Il danno

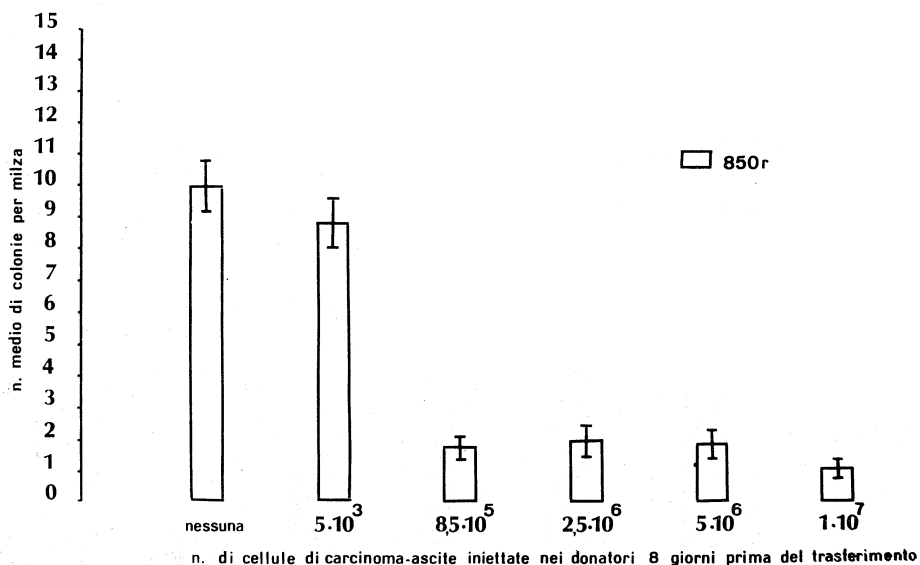


Fig. 2 b. - Cloni esogeni.

Il numero di cloni che si formano nella milza di accettori non cancerosi, X-irradiati con 850 r, è significativamente minore nei topi ricostituiti con cellule di midollo osseo proveniente da donatori cancerosi, inoculati 8 giorni prima con dosi di cellule tumorali uguali o superiori a $8,5 \times 10^5$, che nei topi di controllo, ricostituiti con cellule di midollo osseo provenienti da donatori normali. Ogni valore è la media di 20 osservazioni \pm E.S.

midollare potrebbe derivare invece dall'azione: 1) di virus leucemogeni, associati al tumore di Ehrlich o 2) di qualche fattore solubile mielotossico liberato dalla neoplasia.

Per saggiare la prima ipotesi abbiamo già fatto alcune ricerche, ma il virus che per ora abbiamo isolato dal nostro carcinoma ascite è citopatico a differenza dei virus leucemogeni che in genere non lo sono [13]. Inoltre, tale virus, inoculato ripetutamente in topi per via intraperitoneale non ha provocato alcun fenomeno immunodepressivo.

Per quanto riguarda la seconda ipotesi sono ancora in corso indagini sul liquido ascitico del carcinoma di Ehrlich; i primi risultati indicano che il liquido acellulato, ripetutamente iniettato per via intraperitoneale in animali provoca immunodepressione verso gli antigeni eterologhi, come le

emazie di montone, in misura omologa a quella delle cellule neoplastiche, agendo anche qui a livello degli elementi staminali del midollo osseo.

L'inibizione di questi elementi potrebbe essere la causa prima e comune dell'immunodepressione causata da tumori maligni di differente origine, essendo stata recentemente osservata sia nella leucemia murina da virus di Friend [14] che in topi trattati con un cancerogeno chimico, il dimetilbenzantracene [15].

Attualmente le nostre ricerche si stanno sviluppando in due direzioni. La prima, biochimica, nel tentativo di isolare il fattore mielotossico del liquido ascitico; la seconda, immunologica, volta ad identificare il compartimento cellulare (linfociti B o T) direttamente interessato nel fenomeno immunodepressivo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. MOCARELLI, N. NATALE, F. DE FERRARI, M. L. VILLA e E. CLERICI, « Atti Soc. ital. Pat. », *II*, 675 (1969).
- [2] N. K. JERNE e A. A. NORDIN, « Science », *140*, 405 (1963).
- [3] W. S. CEGLOSKY e H. FRIEDMAN, « J. Immunol. », *103*, 460 (1969).
- [4] L. BORELLA, « J. Immunol. », *103*, 185 (1969).
- [5] S. P. CHAN, W. HOOK, W. TURNER e M. A. CHIRIGOS, « Infection and Immunity », *1*, 288 (1970).
- [6] J. STJERNWARD, « J. natl. Cancer Inst. », *36*, 1189 (1966).
- [7] R. KEANEY e L. E. HUGHES, « Brit. J. Cancer », *24*, 319 (1970).
- [8] R. K. SHAW, D. R. BOGGS, M. L. FAHEY, E. FREI, E. MORRISON e J. P. UTZ, « Arch. intern. Med. », *106*, 467 (1960).
- [9] W. A. HOOK, M. A. CHIRIGOS e S. P. CHAN, « Cancer Res. », *29*, 1008 (1969).
- [10] G. M. SHEARER e G. CUDKOWICZ, « J. exp. Med. », *130*, 1243 (1969).
- [11] J. F. A. P. MILLER, *Cellular basis of humoral responses*. Comunicazione al « VII Congress of the International Society of Allergology », Firenze (Ottobre 1970).
- [12] J. E. TILL e E. A. MC CULLOCH, « Radiat. Res. », *14*, 213 (1961).
- [13] G. PASTERNAK, « Adv. Cancer Res. », *12*, 1 (1969).
- [14] M. BENNET e R. A. STEEVES, « J. natl. Cancer Inst. », *44*, 1107 (1970).
- [15] G. F. ROWLAND e C. M. HURD, « Nature », *227*, 167 (1970).