

AZIONE DEL BENZOPIRENE IN ANFIBI URODELI  
GASTEROPODI E INSETTI. — G. P. MORETTI e L. BELLINI.

(Dall'Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata dell'Università di Camerino).

Sezione di Camerino — Seduta del 15 giugno 1951.

I) Nel tritone (*Molge cristata* Laur. var. *Karelinii* Strauch). — Martella (1) con spennellature cutanee di catrame ottenne ulcerazioni senza proliferazione epiteliale. Neukomm (2) con catrame, benzopirene, metil-colantrene osservò l'instaurarsi di neoplasie epiteliali, con precocità di comparsa direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza cancerigena ed inversamente all'età del tessuto.

Schreiber-Schreiber-Kösch (3), iniettando soluzioni oleose di catrame e di 1-2 benzopirene, ottennero neoplasie in tutti i soggetti trattati con catrame, oltre un caso di metastasi polmonare ed uno cardiaco; nei soggetti iniettati con benzopirene ebbero formazioni a carattere nettamente neoplastico, con infiltrazione e degenerazione cutanea con partecipazione dello strato spinoso e basale dell'epidermide.

Ciaccio e Paccagnella (4) descrissero solo formazioni granulomatose in soggetti iniettati in cavità peritoneale con soluzione oleosa di benzopirene.

Raunich (5), riprendendo gli esperimenti dei precedenti AA., ottenne con iniezione di benzopirene al 2% in olio di oliva risultati assai concordanti con quelli di Koch, Schreiber-Schreiber (5), riconoscendovi le caratteristiche proliferazioni cellulari di tipo neoplastico, pur consigliando una rigorosa prudenza nell'omologare tali alterazioni con quelle di tipo sarcomatoso dei mammiferi.

Lo scopo delle nostre ricerche è stato quello di stabilire, secondo i suggerimenti di Schreiber e Raunich, se i grassi animali inibiscano o meno, e se mai in quale misura, lo sviluppo di neoplasie indotte da idrocarburi oncogeni nel tritone, posto che i precedenti AA. avevano usato come solvente olii vegetali.

Abbiamo sperimentato su ♂♂ e ♀♀, sessualmente maturi o no, iniettando sotto cute benzopirene sciolto a saturazione (60°C) in grasso di maiale, in ragione di cc 0,2 per volta, ripetendo fino a 5 volte l'iniezione per un periodo variabile da 20 a 45 giorni. I soggetti venivano iniettati sempre in regione dorsale: alla base della coda in rapporto al cinto pelvico, tra torace e addome, infine in rapporto al cinto scapolare per sta-

Ringraziamo vivamente la Casa Roche che ci ha fornito in omaggio il benzopirene e il dibenzantracene.

bilire se vi fosse un eventuale gradiente neoplastico orientato in senso cefalo-caudale, come fu prospettato per il potere rigenerativo. Le regioni iniettate venivano asportate a tempi variabili, compresi tra 25 e 53 giorni dalla prima iniezione, fissate in Duboscq-Brasil, affettate in serie (10  $\mu$ ) e colorate con emallume Carazzi-Fucsina, Mallory ferrica o sottoposte alla reazione di Feulgen. Il confronto veniva fatto con tessuti controlaterali iniettati con solo grasso o non iniettati.

Il quadro istopatologico sotto indicato, percorso per intero da un solo individuo, si arrestò invece a neoplasie incomplete o meno evidenti o parziali e isolate negli altri 9 soggetti.

a) Formazione di lunghe tasche epidermiche intorno al materiale iniettato con uno strato di cellule cornee che accompagnano il lume in prossimità dell'orifizio. b) Intensa proliferazione epidermica infiltrantesi entro il connettivo e lo strato muscolare, con cellule mostranti mitosi atipiche e cromatina diversamente distribuita ai due poli. Il DNA appare talvolta accumulato al polo del nucleo rivolto verso la linea di marcia infiltrativa. c) Fenomeni di picnosi e cariocessi riconoscibili negli ammassi concentrici di piccole cellule rotondeggianti, di ignota origine, nella zona di infiltrazione e caratterizzate dal nucleo frammentato, lobato, con cromatina intensamente colorabile e talvolta dispersa in granuli entro il citoplasma. d) Assenza di cromatofori in corrispondenza del canale dell'iniezione, considerevoli emorragie nella zona di infiltrazione. Il benzopirene giunge quindi a scatenare atipia cellulare, infiltrazione e distruzione dei tessuti vicini anche se disciolto in grasso subomologo, con una frequenza che è peraltro da stabilirsi comparativamente con i solventi vegetali. Circa l'eventuale gradiente di processi oncogeni lungo l'asse cefalo-caudale non si hanno sufficienti dati per poter esprimere un giudizio.

II) Nella Chiocciola (*Helix adspersa* Mull). — Circa l'azione degli agenti cancerogeni sui Molluschi, riprendendo le prove di Battisti citate da Rondoni (6) abbiamo applicato le sostanze sull'epitelio dell'epato-pancreas, rivelatosi (Yojet-Lavergne) (7) fra i più sensibili all'azione del benzopirene.

Ci siamo posti i seguenti quesiti:

a) Azione di contatto dell'olio di antracene e dell'olio di Scisto (230°-270°C.), con controllo di olio di vasellina. b) Azione del benzopirene. c) Azione del benzopirene associato a diete ritenute oncogene (colesterolo, farina di avena, lanolina, ormoni estrogeni).

Le prove indicate con a), condotte con lo stesso procedimento indicato per b) e per c), fallirono per intollerabilità degli olii applicati direttamente sull'epato-pancreas, da parte del gasteropodo che veniva a morte, anche per modesti dosaggi, entro le 48 h.

Le prove indicate con b) e con c) furono condotte nel seguente modo: si praticava una finestrella di pochi millimetri di diametro sulla conchiglia, in prossimità della columella, si assorbiva l'abbondante secrezione, si applicavano i cristalli di benzopirene in quantità eccessiva direttamente, o previa ustione, e infine si otturava con paraffina. La mortalità per l'intervento era quasi nulla (5-10%). Furono operati circa 600 soggetti di uno o due anni. In parte furono alimentati con diete oncogene (500), in parte con dieta naturale (100); sacrificati dopo 20-40 giorni, si fissavano con sublimato acetico, Bouin, Duboscq-Brasil, Tellyensnietzy e

si coloravano le fette in serie (5-10-30  $\mu$ ) con ematossilina Carazzi-eosina, Mallory ferrica. Fu eseguita anche la Feulgen.

Le modificazioni istologiche ottenute si possono così indicare: accentuate iperplasie ed ipertrofie a carico dell'epitelio, del connettivo sottopieliale e delle formazioni acinose della ghiandola. La proliferazione epiteliale nella regione lesa e trattata con benzopirene è estremamente marcata, sia in senso verticale in seguito alla sovrapposizione di numerosi strati, sia in senso orizzontale, con ondulazione della superficie esterna in seguito alla moltiplicazione delle cellule di ciascun strato. Il pieghettamento dell'epitelio si fa accentuato entro i primi 20 giorni.

Il connettivo sottostante partecipa con metaplasia complicata da processi di riparazione cicatriziale. In qualche caso (10 individui) abbiamo riscontrato cellule atipiche a disposizione disordinata o concentrica addentrantesi ed avvolgenti le formazioni acinose che appaiono in parte anche distrutte. Ampie cavità o lacune, vuote o contenenti cellule in disfacimento tra regione corticale e regione midollare.

La Feulgen nelle cellule atipiche in regione connettivale mostra nuclei chiari giganti (36-40  $\mu$  contro 8-10  $\mu$  delle cellule normali), picnotici e in carioressi. Tali modificazioni non sono discernibili nei controlli.

III) Nel limnofilo (*Limnophilus rhombicus* L.-Tricotteri). — Per la sperimentazione degli idrocarburi cancerogeni sugli insetti in ninfosi, propostaci da L. Gianferrari, è stata scelta la larva di questo insetto.

Nelle larve in V stadio, si infilava attraverso il mammellone dorsale del I urite una punta *micro* di acciaio inossidabile della lunghezza di 2-3 mm e della sezione di 1/10 sulla quale era stato fatto depositare, per evaporazione del solvente (benzolo), una microdrusa di cristalli aciculari di benzopirene. Nei controlli si introducevano puntine trattate solo con benzolo lasciato evaporare.

Non riteniamo di possedere ancora elementi indicativi su certe strutture insolite, irreperibili nei controlli, riguardanti le zone a nuclei Feulgen-negativi del mesenteron con disordinata disposizione delle cellule dell'epitelio, talvolta disposte in senso concentrico. Il reperto insieme ad altri che per ora non indichiamo deve essere ulteriormente indagato.

---

(1) *Riv. Biol.*, 1935, 18. — (2) *Lab. Zool. An. Comp. Un. Lousanne*, 1938-1939. — (3) *Bull. Ass. franc.*, 1939, 28. — (4) *Atti R. Ist. Ven. Sci. Lett. Arti*, 1942-1943, 102. — (5) *Riv. Biol.*, 1949, 41, 1. — (6) *Il Cancro. C. E. A.*, Milano, 1946. — (7) *Comp. Ren.*, 1937-1948, 224, 226, 227.