

18. I MECCANISMI DELLA CANCEROGENESI (*).

Il vero punto cruciale della cancerologia moderna consiste nello studio degli eventi biochimici che conducono alla trasformazione maligna della cellula normale. Infatti vale ormai come accertato: 1°) che numerosi agenti esterni, chimici, fisici, biologici (parassiti, virus ecc.) possono rappresentare altrettante cause remote od indirette — veri agenti eziologici esterni — di cancro; che perciò si deve sicuramente riconoscere una eziologia multipla dei tumori maligni; lo scoprire nuovi di tali agenti potrà dunque avere una importanza pratica considerevole, suggerendo misure profilattiche o chiarendo problemi clinici o di patologia professionale; ma non risolverà probabilmente il problema fondamentale, quello patogenetico; 2° che tutti questi agenti esterni turbano in modo irreversibile (almeno secondo le attuali osservazioni) la vita cellulare nel punto di loro applicazione (¹), per cui la cellula si comporta ormai in modo analtruistico ed aggressivo, ossia ha acquisito la così detta malignità biologica: la vera causa diretta del cancro sta proprio in questo sviamento biologico della cellula, ossia è sostanzialmente un problema di fisiologia cellulare. Si può dire che avviene una commutazione dei numerosi e diversi fattori eziologici esterni in uno o pochi fattori endocellulari della malignità. Ed è su questo pervertimento cellulare che devono oggi convergere le indagini sperimentali

La cancerogenesi è dunque un processo irreversibile, locale, evocabile per opera di agenti numerosi. Non è il caso di enumerare questi agenti cancerogeni esterni, di cui oggi taluni servono correntemente nei nostri laboratori per la produzione dei tumori. Ci possiamo limitare qui ad illustrare brevemente alcuni casi paradigmatici di cancerogenesi sperimentale. Anzitutto conviene ricordare quella da idrocarburi sintetici, di cui i più attivi sono il metilcolantrene, il 3,4-benzopirene, il 1,2,5,6-dibenzoantracene, il 1,2-ciclopenteno-5,6-benzoantracene, il 2-metil-3,4-benzofenan-

(*) Lezione tenuta nell'Istituto il 12 maggio 1939-XVII.

trene (W. E. Bachmann e collab.); e, secondo le osservazioni recenti di Iball, il 9,10-dimetil-1,2-benzoantracene, che dovrebbe produrre tumori nel tempo minimo. Sono ormai alcune centinaia gli idrocarburi aromatici a nuclei condensati, che sono stati saggiati; e si può dire che accanto ai potentissimi agenti cancerogeni ricordati ce ne sono altri poco o pochissimo attivi, fino a quelli che, almeno per durate di applicazione contenute nei limiti fissati dalla sopravvivenza degli animali, sono del tutto inattivi. In seno a questo gruppo di composti sono state scoperte certe regolarità di rapporti fra funzione cancerogena e struttura dell'idrocarburo: così le sostituzioni con gruppi metilici nel sistema del 1,2-benzoantracene in corrispondenza delle posizioni 9 e soprattutto 10 (meso-carboni) ed anche in corrispondenza della 5 sono particolarmente atte a favorire la funzione cancerogena (Bachmann e collab., Fieser); mentre la introduzione degli stessi gruppi metilici nel quarto anello del sistema benzoantracenicico è deprimente per detta funzione (Fieser). Profondamente deprimente è in genere la ossigenazione di questi sistemi policiclici; e la loro idrogenazione pure non ha effetti favorevoli, un 1',2'-diidro-4'-metil-3,4-benzopirene essendo forse finora il caso meglio accertato di un idrocarburo idroaromatico con una certa attività cancerogena (Fieser). Corpi a configurazione generale della molecola simile a quella del dibenzoantracene ma con N al posto di uno o due mesocarboni (dibenzoacridine, dibenzofenazine) conservano più o meno una certa attività (Cook e collab., Bachmann e collab., Rondoni e Corbellini). Queste interessanti regolarità rapportanti la struttura alla funzione cancerogena non hanno però un valore generale; basta a dimostrarlo il fatto che sostanze sicuramente cancerogene si conoscono in gruppi di sostanze di tutt'altra natura chimica, come ad esempio la naftilamina, l'o-aminoazotoluolo ed affini azocomposti. Sono dunque regolarità per così dire interne in una classe di importanti composti, le quali vanno tuttavia attentamente analizzate perchè possono servire a svelare il meccanismo di *almeno questa forma di cancerogenesi*. Ivi può la forma della molecola avere importanza per la sua penetrazione nella cellula e quindi per l'ingranaggio in certi meccanismi endocellulari. Noi conosciamo dalla chimica degli enzimi i casi di impedimento sterico, per cui un certo substrato non può essere attaccato perchè la disposizione spaziale di un suo gruppo atomico impedisce l'accesso della molecola del catalizzatore al substrato stesso. In modo simile forse in certi sistemi poli-

ciclici la disposizione reciproca degli anelli e la presenza di gruppi sostituenti in certe posizioni piuttosto che in certe altre possono potentemente influenzare l'attività. Ma probabilmente le proprietà fisiche delle sostanze cancerogene hanno pure, come io ho detto già con Corbellini (1936), una importanza considerevole per la loro funzione. Sebbene Bachmann e collaboratori abbiano descritto già tre idrocarburi esaciclici (1,2,3,4-dibenzopirene, 3,4,8,9-dibenzopirene, antantrene) come modicamente attivi, rilevando che si tratta di sostanze molta scorsamente solubili nei solventi organici e nei lipidi e che perciò la scarsa solubilità non preclude la funzione cancerogena, tuttavia sono idrocarburi pentaciclici i più attivi e sono sostanze che, insolubili in acqua, si sciolgono bene nei grassi e, come da recenti osservazioni di Brock, Druckrey ed Hamperl (1938) sul benzopirene, si sciolgono nei liquidi organici in virtù del contenuto di questi in lipidi ed anche in sostanze idrotrope nel senso di Neuberg. E' probabile che l'accesso alla cellula dunque sia ottenuto in gran parte attraverso alla dissoluzione nei lipidi cellulari. Come questi ultimi AA. hanno rilevato, il benzopirene (e come lui è probabile si comportino altri idrocarburi) ha forte attività superficiali ed aderisce perciò tenacemente alla superficie delle strutture cellulari; e può dializzare attraverso a membrane di collodione. Naturalmente la penetrazione pura e semplice dell'idrocarburo non esaurisce davvero la spiegazione della sua funzione. Non è ancora ben chiaro se e fino a che punto l'idrocarburo sia metabolizzato: le più recenti osservazioni farebbero ammettere che almeno il benzopirene (che può essere seguito nei tessuti per la sua fluorescenza eccitabile dai raggi ultravioletti) si conserva a lungo in loco. Ma si può avere un metabolismo limitato, consistente in sostituzioni non modificanti profondamente il tipo strutturale e perciò non implicanti necessariamente modificazioni degli spettri di assorbimento o di fluorescenza. Fieser tenta di dimostrare che gli idrocarburi più attivi sarebbero quelli più atti ad entrare in reazioni di copulazione con sali di diazonio; e soprattutto quelli più facilmente ossidabili mediante tetracetato di piombo. Quest'ultima reazione conduce a prodotti che sarebbero di alte ulteriori possibilità reattive; e, pensa Fieser, potrebbe pure essere confrontabile con reazioni svolgentisi nei tessuti, fornenti l'idrocarburo di gruppi funzionali (come il gruppo acetilico nella ossidazione con tetracetato di Pb), i quali potrebbero servire poi a coniugare l'idrocarburo stesso con costituenti cellulari. Ma sono necessarie qui nuove ed estese ri-

cerche: pur di recente si è fatto notare da Velluz, che non la facile ossidabilità ma anzi un alto grado di stabilità chimica caratterizza gli idrocarburi cancerogeni. Probabilmente per la piena funzione devono coincidere parecchie proprietà fisiche, chimico-strutturali e reattive; e non si può per ora mettere in esclusiva o prevalente luce una sola proprietà.

In difetto di dati coerenti dal lato strettamente chimico-fisico noi possiamo attaccarci allo studio istologico della funzione cancerogena degli idrocarburi. Mi pare, in base a ricerche personali e di altri (Morelli, Haagenzen e Krehbiel, Klinke, Brock, Druckrey e Hamperl), che l'azione di uno dei soliti potenti cancerogeni sui tessuti (in specie connettivo) si possa suddividere istologicamente in tre stadi: nel primo si hanno essenzialmente fenomeni a carattere regressivo (necrosi) e riparativo (proliferazioni a significato rigenerativo e demarcativo), durante cui probabilmente lo agente chimico è ripartito, forse elaborato o diluito in modo da assumere la forma od il grado di concentrazione atto alla manifestazione funzionale: questi fenomeni sono del tutto aspecifici, si hanno con idrocarburi cancerogeni o no (io ho studiato il perilene), perfino con semplici grassi (lardo). In un secondo stadio insorgente bruscamente e spesso pluricentricamente, si costituisce un tessuto di neoformazione profondamente atipico, con grande polidimensionalità cellulare e polimorfismo nucleare: sono evidentemente sconvolti i meccanismi di regolazione della moltiplicazione cellulare: è questo il primo segnale della degenerazione maligna. In un terzo stadio questa si afferma, i focolai blastomatosi crescono in forma aggressiva ed autonoma; ma la atipia cellulare spesso si attenua, si direbbe che il tessuto neoplastico ormai costituito si sistema relativamente nella sua nuova veste di tessuto sarcomatoso colle note varietà. Pare che si sia originata, dopo un periodo di profondo sconvolgimento citologico, una nuova razza cellulare con una certa fissità di caratteri propri morfologici e funzionali. Quando si studia l'azione degli idrocarburi sugli epiteli cutanei, come nelle comuni esperienze di spennellatura, allora tutta questa successione di periodi è meno chiara: però, a detta anche di autori che hanno studiato il cancro da Röntgen, istogeneticamente non molto dissimile da quello da idrocarburi, sono anche qui spesso evidenti polimorfie cellulari ed irregolarità nucleari: lo stesso Stämmeler, dopo aver negato nel cancro da catrame ed in quello da Röntgen le anomalie nucleo-cellulari al primo inizio della proliferazione in profondità, poi le dimostra in una figura.

Che gli epiteli siano meno sconvolti dal primo esplodere della funzione cancerogena non deve fare meraviglia, trattandosi di cellule più differenziate (almeno negli epiteli a tipo cutaneo, i più largamente e sicuramente ricettivi), più stabilizzate, con meno risorse adattative ed evolutive. Io penso che la funzione cancerogena consista in una lesione cellulare, colpe in modo ancora oscuro i centri direttivi dei processi di crescita e moltiplicazione e quindi probabilmente il nucleo, la quale lesione corrisponde ad una certa gradazione di intensità dell'agente lesivo. Da tutte le ricerche istologiche recenti risulta che gli idrocarburi sono dotati di azione necrosante; ma questa azione necrosante in senso grossolano, che del resto è propria di altri agenti cancerogeni, comprese le radiazioni ionizzanti, non è l'essenziale, perchè anche sostanze non cancerogene la posseggono e tutt'al più ha una influenza favorente sulla crescita patologica fornendo prodotti di demolizione a loro volta utilizzabili nelle nuove costruzioni cellulari o sostanze a tipo di necroormoni eccitanti la proliferazione. La vera lesione cancerogena deve essere qualcosa di più fine e quasi direi di intonato a determinati ritmi metabolici nelle strutture nucleari: io ho parlato (1937) di « zonale Schädigung » per intendere una lesione derivante da una certa zona di intensità dello stimolo, sopra la quale si ha la morte cellulare o comune necrosi e sotto la quale si hanno alterazioni lievi e reversibili. Vorrei ricordare che anche un altro processo patologico è messo in opera proprio da agenti contenuti in una certa zona ottimale di intensità: la infiammazione. La lesione specifica cancerogena o degenerazione neoplastica della cellula, che come tanti processi degenerativi della patologia cellulare può essere indotta da agenti diversissimi purchè atti ad ingranare in certe reazioni metaboliche, si differenzia però da altre lesioni perchè essa si imprime in modo fatale nella razza cellulare, ossia si trasmette alla discendenza della cellula prima colpita. Questo modo di vedere in fondo si avvicina in parte a quello sostenuto da Haddow, secondo cui la prima azione dei cancerogeni è anzitutto una azione lesiva per le cellule, almeno per quelle di organismi superiori (mentre per metazoi inferiori Reimann e Hammett, Owen, Weiss e Prince avrebbero trovato una azione direttamente eccitante la moltiplicazione). Le esperienze su espianti dimostrano azione nulla (Magat, Levenson e Volkeson) o piuttosto una azione lesiva (Earle e Voegtlin). Ma vorrei soprattutto valutare le esperienze di Creech su culture di fibroblasti di topo, dimostranti bensì una accelera-

zione della crescita ad opera dei più comuni idrocarburi cancerogeni; ma accompagnata da manifeste alterazioni della mitosi (in specie precoce segmentazione dei cromosomi nella profase e vari caratteri rassomiglianti a quelli delle mitosi con meiosi nella maturazione delle cellule germinali). Il carattere lesivo dunque delle azioni degli idrocarburi non si oppone neppure alla contemporanea eccitazione dei processi proliferativi, almeno in alcuni elementi cellulari finora studiati. Prima di andare oltre, un punto mi preme di lumeggiare: c'è stato e c'è ancora chi ritiene importante nella cancerogenesi una azione generale degli idrocarburi. Ora questa realmente esiste: le piccole quantità di sostanza che passano in circolo o forse più semplicemente i prodotti di demolizione proteica riassorbiti a partire dai ben dimostrabili focolai necrotici (come pensano Brock, Druckrey ed Hamperl) determinano un quadro di tossicosi, cui si deve non di rado una mortalità precoce degli animali: si ha trasformazione mieloide del fegato e della milza, amiloidosi e paramiloidosi di organi interni, atrofia delle gonadi. Ma tutti i più obiettivi ricercatori sono ormai unanimi (Staemmler, Bauer, Brock e collab. ecc.) nel vedere qui fenomeni secondari e collaterali senza importanza per la funzione cancerogena, anzi forse spesso di ostacolo a questa (²). Anche le osservazioni nostre (Beltrami) parlano per la indipendenza della cancerogenesi da alcune di queste meglio studiate alterazioni organismiche: seguendo l'epoca di comparsa dei tumori cutanei da benzopirene e registrando con criteri approssimativamente quantitativi i reperti di amiloidosi e trasformazione mieloide, si trova una larga dispersione di questi reperti e nessuna correlazione regolare coll'insorgenza del cancro.

Ma veniamo brevemente ad altro tipo di cancerogenesi che eziologicamente è ben lontano dal precedente: alla cancerogenesi da agenti filtrabili, oggi compresi sotto il nome improprio di *virus* od *ultravirus*. Se ne conosce da tempo un esempio nei tumori mesenchimali del pollo a tipo per lo più di sarcomi altamente maligni, quali furono scoperti da Rous nel 1911 eppoi descritti via via da Fujinami, Pentimalli, Teutschländer. Il sarcoma del pollo tipo Rous è uno dei più affascinanti problemi biologici: l'agente, facilmente distaccabile dalle cellule con mezzi meccanici (filtrazione, forse centrifugazione frazionata ed ultracentrifugazione) o mediante il disseccamento od altri interventi che lo rispettano mentre distruggono bensì le cellule, provoca negli elementi mesenchimali di un

nuovo ospite (pollo od anatra) una proliferazione pronta, che in pochi giorni assume i caratteri di alta atipia ed aggressività: le osservazioni recenti di Mauer, in gran parte confermantì le classiche ricerche di Pentimalli, fanno ritenere che anche dopo l'inoculazione dell'agente di Rous nella muscolatura pettorale del pollo, in analogia a quanto fu detto per gli idrocarburi, si ha prima una proliferazione a carattere rigenerativo, aspecifico, sulla quale si impianta poi pluricentricamente la trasformazione maligna. Di recente Lucké ha descritto nella rana un adenocarcinoma renale da agente filtrabile altamente organotropo. Ma soprattutto si è data importanza a neoplasie da agente filtrabile nei mammiferi: si potrebbe ricordare il mixoma del coniglio molti anni fa illustrato magistralmente da Sanarelli, che per molti caratteri richiama più una forma granulomatosa che una neoplastica. Pure questa singolare affezione pare avere rapporti immunologici col fibroma del coniglio selvatico descritto di recente da Shope in America, anch'esso a trasmissibilità acellulare e che secondo osservazioni di Andrewes, Ahlström, Foulds e Gye nelle zone catramate della pelle attecchirebbe facilmente assumendo comportamento maligno. In particolare il papilloma del coniglio selvatico (a coda cotonosa), scoperto pure da Shope, è stato oggetto di lunghe ricerche in vari laboratori: si tratta di un tumoretto fibro-epiteliale, largamente corneificante, per lo più multiplo, che è trasmissibile acellularmente (col filtrato o mediante pezzetto soggiornante da mesi sotto glicerina 50 %) non solo ad altri conigli della stessa razza, ma anche ai nostri domestici. Però il fatto singolare è questo: nei conigli domestici si esaurisce la trasmissibilità acellulare, come se l'agente filtrabile sparisse o venisse coperto da un inibitore. Io con Eisen ho ottenuto facilmente l'attecchimento da materiale pervenuto dal laboratorio di Shope nei nostri conigli; ma vari tentativi di trasmissione da coniglio a coniglio sono anche a noi falliti, tranne in un caso nel quale il materiale era stato trattato con acetone, che avrebbe potuto estrarre ed eliminare un inibitore. Tuttavia siccome rari e modici attecchimenti in un primo passaggio da coniglio domestico a coniglio domestico furono osservati anche da Shope, noi non osammo troppo valorizzare il nostro esperimento per appoggiare l'idea dell'inibitore. Soprattutto importante però è la trasformazione cancerosa del papilloma, che in laboratori inglesi ed americani pare essere relativamente frequente, sebbene sempre estremamente tardiva, dopo oltre i 6 mesi dalla inoculazione. Secondo le os-

servazioni di Rous e Beard la catramatura favorirebbe particolarmente la trasformazione in cancro: già dopo 3 mesi di catramatura della pelle di un orecchio, l'iniezione endovenosa del virus porterebbe ad una pronta esplosione della degenerazione maligna. Nelle nostre esperienze si è avuta bensì una azione favorente della catramatura sull'attecchimento del papilloma, per esempio sui padiglioni auricolari; ma si è visto come anche altri interventi irritanti, per esempio ustioni, facilitano la fissazione del virus circolante per iniezione endovenosa. Un inizio di vegetazione in profondità dell'epitelio abbiamo avuto in due animali, in zone (padiglioni auricolari) sottomesse pure a catramatura, per cui riesce difficile sceverare esattamente la funzione dell'agente chimico da quella dell'agente virus. Solo in un terzo animale, sopravvissuto ben 14 mesi, si è avuto infine lo sviluppo di un vero cancro profondamente infiltrante, a partire da puro papilloma (regione addominale). Io concludi dunque che la cancerogenesi sulla base del papilloma non deve essere un evento di alta frequenza. Anche Höra in Germania ha avuto solo due cancri su tre animali vissuti oltre un anno. Probabilmente sono in giuoco differenze razziali fra i conigli a dare differenze nella quota di cancerizzazione del papilloma nei vari paesi. Pur riconoscendo l'interesse di queste ricerche, non mi pare che esse portino niente di decisivo in favore di una concezione generale della cancerogenesi basata sulla funzione di così detti virus, come vorrebbe Rous e come sono propensi a sostenere vari altri AA. angloamericani. Si arriva infatti da questi a sostenere perfino che il virus di Shope rappresenti il virus del cancro; e che gli stessi agenti chimici non farebbero che attivare dei virus latenti già presenti (virus indigeni, Andrewes) e che dunque questi virus sarebbero i veri agenti della malignità, diventando una specie di simbionti endocellulari moltiplicantisi insieme alle cellule ed imprimenti a queste le proprietà maligne. Non che la biologia generale non offra analogie allettanti, per esempio nelle così dette simbiosi ereditarie di certi protofitti con organi di insetti, secondo le ricerche di Pierantoni ed altri; ma le analogie non sono fatti dimostrati ed a me pare che questi AA. abbiano corso troppo nel valorizzare la trasformazione cancerosa del papilloma di Shope. Questa intanto non è una assoluta novità: sulla base di papillomi, infettivi o no, nell'uomo e negli animali possono svilupparsi cancri con diversa frequenza. La trasformazione maligna del papilloma di Shope è tutt'altro che paragonabile per regolarità e precocità a quella indotta dagli idrocar-

buri più attivi; ed è molto dipendente da fattori irritativi accessori (nel mio unico caso ben chiaro c'era anche una infestione del papilloma con larve di mosche), nonchè probabilmente da fattori genetici. La persistenza prolungata di fenomeni proliferativi a carattere benigno è una occasione frequente all'innestarsi della trasformazione maligna: il papilloma rientra dunque in questa legge generale e, nella graduatoria degli agenti cancerogeni, esso non si inserisce sopra a tutti come l'agente per eccellenza ma piuttosto sotto ad altri molto più regolarmente funzionanti, come appunto gli idrocarburi. Non abbiamo qui il virus del cancro e forse neppure un virus veramente cancerogeno; ma un virus che produce una proliferazione fibroepiteliale benigna con significato innegabile di forma precancerosa. Non è nemmeno giusto secondo me lo stretto ravvicinamento all'agente di Rous, che agisce veramente in modo diretto ed immediato, quale vero *ens malignitatis*, sulle cellule mesenchimali e non già dopo un lungo periodo di induzione il quale fa pensare ad elaborazioni secondarie nei tessuti influenzati.

Comunque sarà interessante ricordare che per l'agente di Rous come per quello del papilloma di Shope si è aperto un nuovo largo orizzonte di studi colle odierne conoscenze sulle virus-proteine. Quest'ultimo agente secondo Wyckoff e Beard sarebbe già stato riconosciuto mediante l'ultracentrifuga come una proteina pesante (p. mol. 25. 000.000) di cui 1 mgr. basterebbe ad infettare un milione di conigli. Per l'agente di Rous, quantunque noto ai biologi da più tempo, la definizione esatta della natura è ancora incerta: a me non pare ancora sufficientemente dimostrata la natura corpuscolata col (così detto) p. mol. di 140.000.000 circa ammesso da Claude e accettato da Stanley. Che si tratti però di un principio chimico, di natura proteica, dunque non di un agente vivo nel senso proprio, pare accettabile dopo le osservazioni fondamentali di uno dei migliori conoscitori dell'argomento, Pentimalli. Forse molti contrasti su dimensioni e natura chimica dell'agente potrebbero essere sanati colla ammissione fatta da questo A. che si abbia a fare con un corpo costituito secondo lo schema dualista proposto da Willstätter per gli enzimi: un vettore colloidale, rappresentato da proteine dei tessuti, sostituibile volta a volta (Pentimalli ha constatato la funzione di vettore della emoglobina), ed un gruppo funzionante specifico, di natura ancora oscura.

Un terzo gruppo di agenti deve essere ricordato come variamente valutato nella cancerogenesi: certi ormoni e precisamente per ora sostanzialmente gli ormoni sessuali femminili, anzi soprattutto gli estrogeni. Senza pretendere di riassumere qui l'arduo argomento, dirò che di una teoria ormonica generale dei tumori maligni non è il caso di parlare, ma che tutt'al più si può mettere in discussione, dopo le ricerche iniziali di Lacassagne, se gli estrogeni possano produrre neoplasie maligne negli organi della sfera genito-mammaria. Si tratterebbe dunque tutt'al più di una azione specializzata su alcuni tessuti, per i quali quelli ormoni sono già stimolanti fisiologici di crescita; tanto è vero che le eventuali alterazioni atipiche sono collegate da numerose forme di passaggio a semplici fatti iperplastici, tanto nella ghiandola mammaria che nella mucosa uterina (ricerche di L. Loeb, Suntzef e Burns). In ogni caso poi si ha a fare con effetti di dosi elevatissime, ben superiori a quelle terapeutiche, per cui un allarme contro una saggia terapia ormonica mi pare del tutto ingiustificato. A riconoscimento poi di quasi tutti gli AA. che si sono occupati dell'argomento, per l'insorgenza della neoplasia a carattere maligno negli animali trattati cogli estrogeni contano molto fattori genetici (ereditari), ben più che per la funzione cancerogena degli idrocarburi. Noi vediamo i fattori genetici affermarsi sempre più netti e sicuri via via che dagli idrocarburi passiamo al virus di Shope e quindi agli estrogeni, per l'azione cancerogena dei quali essi sembrano essere del tutto decisivi. Ma è poi così sicura e regolare, anche a prescindere dalla necessità di concause (età, irritazioni diverse) messe in luce da Loeb e collab., la produzione di fatti iperplastici-neoplastici negli organi della sfera genitale femminile, come vogliono certi autori? Io vorrei accennare alle numerose osservazioni di Silvestroni nel mio laboratorio sulle alterazioni della mucosa uterina in ratti castrati e trattati con estrone e talora con estrone e luteormone: si ha precocemente una dilatazione delle ghiandole con iperplasia e metaplasia dell'epitelio, per cui si formano degli apparenti zaffi di varia forma più o meno addentranti nel chorion mucoso. Talora, specie per trattamento combinato (fig. 36 e 35 della pubblicazione di Silvestroni: Mem. Reale Acc. d'Italia) con estrone e luteormone si osservano lumi rivestiti da epitelii pluristratificati altamente atipici. Sono questi quadri nella porzione alta della cervice uterina di ratto che appaiono i più suggestivi nel senso di una trasformazione neoplastica. Ma, prolungando il trattamento ormonico, Silve-

stroni ha visto spesso regressione di queste alterazioni; ed allora la parete uterina si assottiglia, si ha quasi una trasformazione cistica dell'organo, nella quale ogni apparenza di evoluzione cancerosa è cancellata. Senza negare che sul terreno di fenomeni iperplastici-metaplastici da disendocrinia (accertati anche colla produzione di quadri sperimentali di mastopatia cistica: Burrows ed altri) possano accendersi focolai di malignità biologica, a me sembra che siamo qui di fronte ad un meccanismo patogenetico in parte diverso dai precedenti e che la certamente limitata funzione cancerogena degli estrogeni stia ad un livello assai basso nella gerarchia degli stimoli cancerogeni, essendo in ogni caso la più condizionata da altri fattori sia esterni come genetici. E' di moda un confronto fra struttura chimica degli estrogeni (steroidi) e gli idrocarburi cancerogeni costruiti, almeno alcuni, sul sistema fenantrenico; ed è stata anzi avanzata l'ipotesi che nell'organismo stesso possano formarsi per perversimenti metabolici, a partire per esempio da sterine o steroidi, sostanze a tipo fenantrenico ed a funzione cancerogena. Ma a vero dire la verificaione di questa ipotesi non ha fatto gran progressi, dopo la constatazione che un potente cancerogeno, il metilcolantrene, può prodursi in laboratorio attraverso a complicate operazioni chimiche a partire da un acido biliare ossia da una sostanza fisiologica correlata alle sterine. Anzi Cook stesso ha fatto notare come gli ormoni sessuali, ad anelli largamente idrogenati, non possono a priori ritenersi sostanze cancerogene in base ed analogie cogli idrocarburi, che sono a carattere aromatico e nei quali anzi anche una limitata idrogenazione attenua od abolisce la funzione specifica (v. sopra). Si potrebbero citare anche le recentissime osservazioni di Roffo e di Domagk secondo cui grassi, più o meno ricchi in sterine, somministrati a lungo nella dieta, in specie dopo riscaldamento, o la stessa colesterina irradiata con raggi ultravioletti o no (Roffo, Watermann) produrrebbero tumori lungo il tubo digerente: osservazioni queste di alto interesse e che meritano controllo accurato, come quelle che ravviverebbero il concetto di una funzione oncogena di derivati sterinici da un punto di vista più generale di quello che si riferisce agli steroidi sessuali. Anche più vecchie osservazioni della scuola di Kennaway parlerebbero per una molto blanda azione

oncogena di grassi iniettati nel sottocutaneo di ratti (Burrows, Hieger e K., 1936) e specialmente di catrame di colesterina (colesterina scaldata a 800° in corrente di idrogeno: K. e Sampson, 1928) applicato sulla pelle a topi; ma K. e Sampson fanno giustamente notare che l'azione oncogena di prodotti del genere non dimostra ancora una funzione della colesterina come tale perchè si può avere a fare con profonda disintegrazione di questa e resintesi e condensazione a partire da prodotti di disintegrazione. Io con Carminati e Corbellini non sono riuscito ad ottenere sostanze cancerogene (bensì forse estrogene) dalla prolungata autolisi di poltiglie di organo addizionate di colesterina. La colesterina ed altre sterine paiono davvero favorire certi processi di crescita normale e patologica; ma che una colesterinolisi in vivo produca sostanze cancerogene non è ancora sicuro, mentre più probabile è che con trattamenti in vitro, alcuni dei quali a vero dire molto aggressivi, da corpi a struttura sterinica si arrivi a sostanze cancerogene, le quali però, come nell'esperienze suddette di Roffo coi grassi, sarebbero pur sempre di origine esterna e non prodotte nel metabolismo organico.

C'è qualcosa di comune fra le varie funzioni cancerogene, dalle più potenti e fatali alle più incerte e condizionate? Un fatto comune è la precedenza di proliferazioni a carattere ordinato: questo fatto è appena accennato nella cancerogenesi da agente di Rous, la fase benigna della neoformazione è ivi per così dire oltrepassata di colpo. Lo stesso fatto è importante per durata e talora per estensione in quei casi in cui noi diciamo che esistono lesioni precancerose, le quali pure sono per fatalità dell'esito maligno profondamente differenti da caso a caso. Forse ogni proliferazione cronica di tessuti comunque indotta (processi rigenerativi, irritativi, disendocrini, disontogenetici) ha un grado maggiore o minore di probabilità di degenerazione maligna: solo che in certi casi il grado di probabilità è così basso che l'esito è coperto da altre cause di morte sopravvenienti o non entra nella durata fisiologica della vita della specie.

Così ritorniamo al punto di partenza: in cosa consiste questo sviamento biologico che pare colpire prima o dopo le cellule sottoposte ad un prolungato sforzo moltiplicativo? Le ricerche sul metabolismo delle cellule

neoplastiche, inaugurate da Warburg, non hanno portato alcuna luce sul processo della cancerogenesi: esse hanno portato solo al riconoscimento interessante che la cellula maligna ha una vita preferenzialmente anaerobia e che il metabolismo dei carboidrati presenta un intoppo in qualche stadio precedente la completa combustione di questi, per cui si forma e si accumula dell'acido lattico e la glicolisi predomina anche in condizioni di aerobismo del sistema. Ma questa così detta glicolisi aerobia è tutt'altro che specifica delle cellule neoplastiche, bensì è propria di tutte le cellule in via di involuzione fisiologica o molto labili o comunque danneggiate: essa non è che la espressione misurata con mezzi fisiologici della vera natura regressiva della trasformazione maligna della cellula, la cui struttura è alterata in modo che la respirazione, come processo strettamente legato alla integrità strutturale, è compromessa e la glicolisi funge come principale reazione fornitrice di energia. Del resto anche veri processi degenerativi e necrotici nei tumori sono noti da un pezzo all'istologo. In ogni caso non mi pare che il tipo metabolico della cellula neoplastica possa spiegarne la attitudine alla moltiplicazione sfrenata e la aggressività. Io non saprei davvero aderire alla così detta teoria ischemica, secondo cui nei focolai di proliferazione cellulare sarebbe uno stato eventuale di insufficiente ossigenazione ed un conseguente ricorso delle cellule alla vita anaerobia e quindi alla glicolisi come principale reazione fornitrice di energia, che porterebbero poi alla trasformazione maligna. Infatti ogni crescita, normale o patologica, vuol dire sintesi di costituenti cellulari complessi e soprattutto di proteine; e di solito i processi sintetici sono accoppiati con processi ossidativi atti a fornire loro l'energia necessaria. Come ho detto io anni sono ⁽³⁾ « il problema del cancro consiste più in questi processi ossidativo-sintetici che nel metabolismo disintegrativo (anaerobio) proteolitico e glicolitico, il quale rappresenta puramente il lato negativo dell'anima del tumore e non costituisce l'essenza della degenerazione cancerosa ».

Noi abbiamo svolto tutto un gruppo coordinato di ricerche atte a dimostrare che i fenomeni di crescita attingono l'energia loro necessaria proprio a reazioni ossidative ed implicano esaltamento del metabolismo

respiratorio (aerobio) anzichè anossibiosi. La mia concezione ossibiotica della crescita è appoggiata per la cancerogenesi alle secondo me importanti osservazioni di Deotto (1935), che mediante l'analisi dei gas del sangue irrigante il padiglione auricolare catramato del coniglio ha potuto dimostrare che la catramatura fino alla crescita nettamente infiltrativa dell'epitelio implica sempre aumento di consumo di O_2 e di formazione di CO_2 , senza che mai possa sospettarsi una interferenza con fenomeni di anaerobismo nel periodo precanceroso ed all'inizio della trasformazione maligna (4).

Un gruppo di osservazioni è stato praticato studiando l'influenza che sui fenomeni di crescita esercitano sostanze coloranti del gruppo delle tiazine e fenazine, dotate di una azione eccitante per almeno una sezione dei fenomeni ossidativi organici: secondo le ricerche di Harrop e Barron e di Dickens la tionina e la piocianina hanno infatti funzione favorente la respirazione, anzi quest'ultima anche una azione ostacolante per la glicolisi aerobia. Tutti i fenomeni di crescita da noi studiati sono stati più o meno intensificati da questi veri catalizzatori respiratori in opportune elevatissime diluzioni: crescita di culture di fibroblasti da embrioni di pollo (Beltrami, Soresina), rigenerazione di tessuti di metazoi inferiori (gastrozoiiti di *Obelia geniculata* e polipi e tronco di *Tubularia larinx* in larghe ricerche di Deotto alla Stazione zoologica di Napoli), sviluppo dell'uovo di *Paracentrotus* (Deotto: accelerazione dello sviluppo dallo stadio di gastrule a plutei), crescita di neoformazioni cutanee da benzopirene (solo scarsa azione accelerante sulla comparsa di verruche per parte della tionina secondo Piemonte; accelerazione anche della comparsa di cancri per parte della piocianina secondo la Beltrami).

A queste nostre concordanti osservazioni su substrati biologici diversi e con tecniche diverse aggiungiamo osservazioni numerose di altri AA., secondo cui le condizioni di buona irrigazione sanguigna facilitano i processi rigenerativi (Morpurgo) e la genesi (Leinati) nonchè la crescita dei tumori (Morpurgo ed allievi) mentre la ischemia può essere sfruttata anche chirurgicamente per rallentare lo sviluppo neoplastico (Tansini). Teniamo conto poi di osservazioni di Lipmann secondo cui le culture in

vitro in anaerobiosi riducono enormemente la crescita e la glicolisi non è affatto la reazione energetica specifica della crescita; e di osservazioni di Fürth e collaboratori sulla influenza che lo sbattimento con ossigeno ha sui processi di sintesi nelle cellule dei lieviti. Arriviamo così a persuaderci che i processi sintetici, senza cui non si dà crescita, sono essenzialmente favoriti attraverso a reazioni ossidative; e che la anaerobiosi è nei tessuti in genere una misura di vicariamento o d'urgenza, occorrente quando gli ordegni cellulari sono troppo compromessi per permettere la esplicazione dei processi respiratori completi oppure quando manca comunque disponibilità di O_2 , per esempio, come nell'embrione, per incompleto sviluppo dei meccanismi circolatori. Si tratta di un adattamento secondario dunque ad una minorazione funzionale cui la cellula può anche accomodarsi e che può essere eventualmente utile in certi casi (vita della cellula neoplastica in focolai male irrigati); così come certe minorazioni ed ipoevolutismi sono utili per la vita di certi parassiti. La cellula del cancro può vivere e sopravvivere anche in anaerobiosi; ma non è maligna a causa della anaerobiosi.

E' in conclusione ai meccanismi ancora così oscuri delle sintesi protoplasmatiche che noi dobbiamo rivolgere oggi soprattutto la nostra attenzione per capire la crescita neoplastica. Io ho cercato di riassumere di recente (Klin. Woch. 1938, n. 46) le nozioni più moderne sui processi di sintesi; e non devo ripetermi qui. Mi basti accennare ad esperienze nostre (R. e Pozzi), di Voegtlin e collab., di M. Bergmann e coll., che illustrano una serie di modelli sperimentali di processi di aggregazione e di sintesi nel campo delle proteine. In generale si ammette che siano le catepsine, ossia i sistemi proteolitici endocellulari comunemente meglio noti per la loro funzione idrolizzante (autolisi), che operano i processi di sintesi orientata conducenti alla costruzione delle altamente specifiche proteine cellulari. Una certa serie di osservazioni fanno ritenere che la funzione aggregante o sintetizzante delle catepsine dipenda largamente dal potenziale ossidoriduttivo (Waldschmidt-Leitz): la elevazione di tal potenziale è favorevole alle sintesi, l'abbassamento (condizioni riducenti del sistema) conduce piuttosto alla accentuazione della funzione idrolitica. Io nel 1933

(Cancro, Torino) avanzavo l'ipotesi che gli agenti cancerogeni « elevassero il potenziale ossidativo e per tal via favorissero le sintesi proteiche e la formazione comunque di aggregati superiori, forse abnormi, forse assai meno specifici delle proteine normali dell'organo (sdifferenziazione chimica) o con una specificità in parte nuova o correlata alla trasformazione maligna ». Naturalmente la eccitazione dei proecessi respiratori non può bastare di per sè ad avviare la crescita neoplastica come non basta ad avviare quella normale: la respirazione — dice J. Needham — è un fenomeno *portemanteau*; e sotto ad esso devono agire forze direttive e distributive — derivate in ultima analisi dalla influenza organizzatrice dei geni ereditari — nelle sintesi della crescita normale; ed influenze anormali, lesive, disorientatrici nella crescita neoplastica. Che qualcosa del genere occorra, pare dimostrato dalle osservazioni recentissime di Kögl e Erxleben, secondo cui le proteine dei tumori maligni sarebbero parzialmente racemizzate, ossia conterrebbero alcuni aminoacidi (specialmente a. glutammico, valina, leucina, lisina) non solo della serie l — (naturale) ma anche della serie d — (non presente, salvo rarissime eccezioni, nei substrati naturali). E' noto che nella idrolisi alcalina le proteine si racemizzano artificialmente; ma ciò non accade quasi affatto nella idrolisi acida, la sola usata da Kögl e Erxleben, che si sono giustamente posti l'obiezione. E' urgente il controllo di tali ricerche, che dimostrerebbero come gli agenti cancerogeni possano influenzare la configurazione sterica delle proteine durante i processi di sintesi protoplasmatica.

Questi AA. danno dunque al pari di me molta importanza alla anormalità dei processi di sintesi proteica, dipendente da anomalie dei sistemi enzimatici interessati e conducente a sua volta ad un più o meno spiccato grado di disimpegno delle proteine anomale dai processi regolatori normali dell'organismo (scarsa attaccabilità da parte delle proteasi dei tessuti normali): onde la crescita autonoma e sfrenata. Gli agenti cancerogeni sarebbero probabilmente quelli agenti i quali disorganizzano i sistemi enzimatici endocellulari, conducendo alle sintesi anormali; ma noi sappiamo estremamente poco sulla influenza per esempio degli idrocarburi sopra agli enzimi (abbiamo però spunti di ricerche mie colla Beltrami e di Boyland).

Da tutto l'insieme delle odierne ricerche mi pare possa ritrarsi il diritto di localizzare specialmente nel nucleo il punto di attacco degli agenti cancerogeni, come già accennai sopra. Si capisce ora come la cancerologia ivi si incontri colla genetica: questa è in gran parte un capitolo di fisiologia del metabolismo dei costituenti nucleari più complessi, rappresentati da molecole proteiche, sostenute da una specie di intelaiatura di acido nucleinico: i geni ereditari. Gli agenti cancerogeni perturbano in qualche modo il meccanismo normale delle sintesi, governate largamente dai geni ereditari: si capisce dunque come la funzione cancerogena sia più o meno condizionata da fattori genetici, ossia dalla costituzione del genoma individuale, più o meno labile, più o meno atto a risentire le azioni perturbatrici. Si discutono sul meccanismo della cancerogenesi due ipotesi: 1) che sotto l'influenza degli agenti cancerogeni si formi un principio eccitante la crescita anormale, una specie di metabolita patologico autoriproducendosi per una specie di autocatalisi nelle cellule via via neoformate, in vero *ens malignitatis*; oppure 2) che gli agenti cancerogeni inducano una vera mutazione somatica nel senso dei genetisti, conducente alla nuova razza cellulare maligna. Queste due ipotesi non sono inconciliabili: il principio patologico autoriproducendosi e dominante la crescita patologica somiglia molto ad un gene ereditario anormale; e presenza di elementi anormali nel genoma vuol dire una mutazione.

La teoria della mutazione nei tumori corrisponde in gran parte alla concezione formulata da Boveri nel 1914. Si deve trattare sostanzialmente di una mutazione somatica, ossia di un cambiamento genotipico di una parte dell'organismo, conducente nei due regni a mosaici di cellule normali ed anormali (spesso iperploidi od ipoploidi, per divisione non equazionale). Le m. somatiche possono essere o no accompagnate da modificazioni cariologiche evidenti. La possibilità che cambiamenti riconoscibili del kariogramma manchino pur avendosi vere mutazioni somatiche⁽⁵⁾ mi sembra rispondere alla obiezione spesso fatta che non sempre nei tumori si colgono alterazioni nucleari grossolane come appaiono in certe forme di cancerogenesi sperimentali (sarcomi da benzopirene).

A prescindere dal fatto che le modificazioni cariologiche possono essere superate all'atto della osservazione di tumori costituiti, potendosi avere

una specie di riordino e riequilibrio genico ed una specie quindi di nuova sistemazione nello stato di vita tumorale autonoma delle cellule (v. sopra), si può trattare pur sempre, alla genesi del tumore, di piccole delezioni o deficienze o traslocazioni cromosomiche durante un processo mitotico, non implicanti davvero reperti microscopici evidenti ma bastanti a repartire non equazionalmente certi geni; così per es. nel regno vegetale (A. Chiarugi, loc. cit. pag. 163) « la sottrazione in alcune cellule di sostanze regolatrici dell'accrescimento e della moltiplicazione cellulare e la loro concentrazione in altre possono portare in alcune di esse alla morte, in altre alla perdita in vario grado del potere di coordinazione del loro accrescimento colle altre parti dell'organismo ed alla loro tumultuosa moltiplicazione in masse simili a tumori ». Infine, secondo la concezione conciliativa da me abbozzata fra teoria mutativa e teoria della autocatalisi, si dovrebbe ammettere, più che una ineguale distribuzione di geni normali, la comparsa di una specie di gene patologico, quale un intruso nella compagine genomica. Non si avrebbe quindi la perdita di un gene frenatore della crescita come pensava Boveri ma l'acquisizione di un gene a funzione sintetizzante anormale.

Il gene patologico può farsi in taluni casi errabondo, staccandosi con facilità dalla cellula: allora somiglia molto ad un virus e ci dà il caso del sarcoma di Rous, vero paradigma di *ens malignitatis*, finora non riprodotto con sicurezza nei mammiferi (⁶). Forse quella che potremmo chiamare, non senza qualche riserva per ora, la mutazione genomica cancerogena — una mutazione non letale se anche inducente caratteri degenerativi nella cellula — può occorrere con meccanismi non sempre eguali; e può occorrere anche spontaneamente, come le vere mutazioni (paragonabili ad errori in quella specie di copiatura che è la autopertpetuazione dei geni), con tanta maggior probabilità quanto più cresce comunque la frequenza degli atti moltiplicativi; mentre può essere indotta quasi fatalmente da certi agenti (idrocarburi più efficaci) atti a disorganizzare particolarmente certe strutture nucleari. E' forse utile ricordare come le molecole proteiche siano edifici atomici enormi suscettibili di rimaneggiamenti, di cui noi conosciamo appena alcuni esempi grossolani: le denaturazioni vere e proprie.

Ora proprio alcune di queste denaturazioni sono suscettibili di una specie di trasmissione od autoinduzione limitata in alcuni esperimenti paradigmatici come quelli di A. Fischer e miei sopra alla denaturazione termica (una piccola quantità di proteina scaldata accelera il processo di denaturazione e flocculazione in altra soluzione proteica).

E' forse troppo ardito supporre che ben più fini modificazioni, indotte da certi agenti nelle strutture protoplasmatiche, possano ripetersi per una specie di reazione a catena, generando nelle strutture stesse nuove attitudini funzionali ripetentisi nelle generazioni cellulari? Gli agenti cancerogeni sarebbero paragonabili ad agenti denaturanti a campo d'azione sui sistemi proteici in funzione di enzimi catalizzatori delle sintesi, i quali poi devono in qualche modo essere correlati ai geni ereditari od alle strutture autoduplicantisi del citoplasma che sono interessate nei casi di così detta eredità citoplasmatica. Noi intravediamo molte e fruttifere vie di ricerca, le quali possono essere battute solo con mezzi poderosi, che Enti pubblici e privati possono fornire e che noi studiosi dobbiamo sfruttare con fervido amore per la verità, senza preconcezioni teoriche e senza aspirazioni di beni materiali o di amor proprio esaltato.

BIBLIOGRAFIA

(¹) Gli agenti chimici sogliono produrre il tumore nel punto di immediata applicazione; ma talora possono anche essere convogliati a distanza (così gli idrocarburi cancerogeni sono di sicuro solubili nei liquidi organici a causa del contenuto in lipidi e forse di sostanze idrotrope di questi: Brock, Druckrey ed Hamperl) ed agire su punti particolarmente predisposti per presenza di focolai degenerativi o disontogenie. Alcuni, come l'anilina, la naftilamina, l'o-aminoazotoluolo agiscono sull'organo di eliminazione.

(²) Brock e collab. riconducono alla azione tossica generale la azione inibitrice che Morelli, Haddow ed altri avrebbero constatato di fronte ai tumori da trapianto per opera degli idrocarburi cancerogeni: si sa in realtà come ogni depressione generale dell'organismo agisca sfavorevolmente sugli innesti neoplastici.

(³) R. e Pozzi, H.S. Zeitschr. f. phys. Chem., 219, 26 (1933).

(⁴) Deotto ha seguito il metabolismo anche nei tessuti escissi, mediante accettori artificiali di idrogeno (metodi al bleu di metilene ed al dinitrobenzolo): ma sono le sue esperienze in vivo che dicono molto più che le numerose ricerche fatte coi me-

todi manometrici su sezioni di tessuti sospesi in Ringer e sopravvivenenti. La Bori ha visto che un trattamento che produce proliferazioni non degeneranti in senso blastomatoso (iniezioni di olio al Sudan III nel padiglione auricolare) dà esaltazione più limitata e meno costante dei processi ossidoriduttivi.

(⁵) v. A. CHIARUGI, Atti IV Congr. intern. patol. comparata, Roma 1939.

(⁶) Nelle virus-proteine pare dimostrata la presenza di acido nucleinico. In una brillante esposizione Euler (*Deutsche med. Woch.*, 1938, n. 48-49) dice che certi virus cancerogeni (Rous, ecc.) sarebbero da considerare come nuclei cellulari che hanno subito una mutazione e potrebbero riprodursi come i nuclei delle cellule da cui derivano. Il fatto che ogni virus sarcomatogeno induce nell'ospite un tumore di tipo istologico eguale a quello da cui il virus deriva rafforza l'analogia con un gene ereditario dotato di potere differenziatore specifico sui tessuti.

