
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

BORIS JORQUERA, ALDO ROSSI

Sull'azione del tiocianato di sodio nello sviluppo dell'embrione di pollo

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.6, p. 938–944.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_6_938_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. — *Sull'azione del tiocianato di sodio nello sviluppo dell'embrione di pollo* (*). Nota di BORIS JORQUERA (**), e di ALDO ROSSI, presentata (***) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

Nella presente Nota vengono esposti i primi risultati di una ricerca sulla azione del tiocianato di sodio sullo sviluppo dell'embrione di pollo allevato *in vitro*.

È noto che il NaSCN provoca l'animalizzazione dell'uovo di riccio di mare (Runnström 1928 [1], Lindahl 1936 [2], Ranzi 1939 [3]), e che negli Anfibi causa alterazioni di tutta la morfogenesi dell'embrione e in particolare di quella della corda dorsale e del sistema nervoso centrale (Ranzi e Tamini 1942 [4], Ranzi, Tamini e Storari-Offer 1946 [5], Corti 1950 [6], Ranzi e Gavarosi 1959 [7], Rossi 1964 [8]). Nel pollo è stato osservato che il NaSCN determina un aumento dell'incorporazione della glicina e non modifica l'incorporazione dell'adenina (Rogers 1964 [9]).

Alterazioni dello sviluppo dell'embrione di pollo sono state provocate con varie sostanze chimiche. Il LiCl provoca negli embrioni allevati *in vitro* riduzioni dello sviluppo del cervello, dell'intestino cefalico, del cuore e la ciclopia (Nicolet 1961 [10], Rogers 1963 [11]), inibisce la sintesi proteica e probabilmente quella del RNA (Rogers 1964 [9]). Trattamenti *in ovo* sono stati eseguiti iniettando nel sacco del tuorlo di embrioni a vari stadi dello sviluppo tripan bleu (Beaudouin e Wilson 1958 [12], Mulherkar 1960 [13], Stephan e Sutter 1960 [14], Lanot 1963 [15]), l'acido borico (Landauer 1952 [16]), l'insulina (Landauer e Bliss 1946 [17], Landauer (1947_{a,b}) [18, 19]), Barron e McKenzie 1962 [20]), la nicotina (Landauer 1960 [21]), la colchicina (Gabriel 1946 [22], Overton 1958 [23]), la actinomicina D (Pierro 1961 [24]), la tetraciclina (Bevelander, Nakahara e Rolle 1960 [25]) e la talidomide (Bock e Peters 1963 [26]). Queste sostanze provocano in vario modo malformazioni a carico del becco, dell'occhio, del tubo neurale, delle strutture assili del tronco e della corda dorsale e della conformazione degli arti. Risultati simili si ottengono trattando le uova con il freddo (Ancel 1958 [27]).

MATERIALE E METODO.

Blastodermi di pollo (Livornese bianca) sono stati coltivati *in vitro* su substrato semisolido di agar-albume secondo le tecniche di Spratt (1947 [28]) e di New (1955 [29]). La soluzione fisiologica impiegata è stata quella di

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma e con i contributi del Centro di Neuroembriologia del C.N.R.

(**) Dell'Istituto di Morfologia dell'Università Australe del Cile (Valdivia)

(***) Nella seduta dell'8 maggio 1965.

Howard (1953 [30]). I trattamenti con NaSCN sono stati eseguiti sostituendo nella soluzione fisiologica normale parti equimolari di NaCl con altrettante parti equimolari di NaSCN. Sono state pertanto allestite due soluzioni saline contenenti: 1) NaSCN 0,0123M e 2) NaSCN 0,0246M.

Gli embrioni di pollo sono stati prevalentemente trattati allo stadio di processo cefalico e in qualche caso allo stadio di linea primitiva. La durata del trattamento è stata di 6-12-24-48 ore nelle due soluzioni contenenti NaSCN (escluso il trattamento per 12 ore con NaSCN 0,0123M). Una serie di questi embrioni è stata fissata al termine di ciascun trattamento; altri embrioni, dopo il trattamento di 6-12-24 ore di trattamento con NaSCN 0,0246M, sono stati passati nel mezzo di cultura standard fino a completare le 48 ore di allevamento *in vitro*.

Gli stadi di sviluppo degli embrioni di pollo corrispondono a quelli delle tavole di sviluppo di Lillie revisionate da Hamilton (1952 [31]). Gli embrioni sono stati fissati con Bouin acetico e le sezioni seriate di 7 μ sono state colorate con emallume ed eosina.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Trattamenti allo stadio di processo cefalico (stadi 5 e 5+).

Sono stati studiati complessivamente 27 casi. I risultati fin ora ottenuti dimostrano che gli embrioni trattati per 6-24-48 ore con NaSCN 0,0123M presentano ritardi dello sviluppo e anomalie morfologiche, che aumentano notevolmente eseguendo il trattamento per 6-12-24-48 ore con NaSCN 0,0246M. Gli embrioni trattati per 48 ore con NaSCN 0,0246M dimostrano gravi malformazioni nel loro corpo (Tav. I, fig. 4). Una limitata capacità di recupero si è constatata solo negli individui trattati per 6 ore con NaSCN 0,0246M e riportati nel mezzo di cultura standard (Tav. I, fig. 1), mentre gli embrioni trattati con la stessa dose per 12 e 24 ore, e riportati nel mezzo standard (Tav. I, figg. 2-3), rivelano maggiori anomalie strutturali di quelli fissati alla fine di ciascun trattamento.

Il sistema nervoso degli embrioni trattati per 6 ore con NaSCN 0,0123M e 0,0246M e fissati al termine dell'esperienza non rivelano delle notevoli differenze morfologiche rispetto al sistema nervoso dei controlli. Il neurasse degli embrioni che dopo il trattamento di 6 ore con NaSCN 0,0246M sono stati riportati nel mezzo standard, pur essendo ritardati nello sviluppo, presentano tanto le curvature cefalica e cervicale quanto la rotazione sul fianco destro ⁽¹⁾ che avviene insieme a tutta la parte anteriore dell'embrione (Tav. I, fig. 1). Diversamente il sistema nervoso degli embrioni trattati con le stesse dosi per 12-24-48 ore presentano numerose anomalie: frequentemente è

(1) La parte anteriore degli embrioni appare ruotata verso destra invece di sinistra, poiché l'embrione allevato su mezzo semisolido è adagiato sulla membrana vitellina e quindi è capovolto rispetto alla posizione normale nell'uovo.

ritardata la chiusura del neuroporo anteriore e delle pieghe neurali del neurasse, che si possono anche ripiegare e saldare all'interno del tubo neurale. I cervelli dei trattati per 48 ore tendono ad interrompersi al livello del cervello medio: quando tale interruzione si realizza (Tav. II, figg. 2-3), si sviluppa il prosencefalo mentre sono mancanti il cervello medio e posteriore come anche parte del midollo spinale. In altri casi si ha invece un forte assottigliamento della regione medio-posteriore del cervello e della parte anteriore del midollo spinale, tanto che in alcuni punti il sistema nervoso è rappresentato solo da uno strato di cellule nervose. Il midollo spinale caudale pur organizzandosi in forma di tubo è strutturalmente malformato rispetto a quello del controllo (Tav. II, figg. 4-8). È interessante notare che in questi casi (come anche negli embrioni che sono stati trattati 24 ore con NaSCN 0,0246 M e riportati nel mezzo standard) invece dell'aorta ventrale e delle radici delle aorte dorsali, si è formata un'ampia cavità comunicante con il cuore, che allontana tutti gli organi fra loro e che con ogni probabilità ha agito meccanicamente anche sul sistema nervoso, distanziando la regione prosencefalica dal rimanente neurasse (Tav. II, figg. 1-2-3).

Variabile è stato lo sviluppo delle vescicole ottiche e quello del cristallino: pur non presentando delle particolari modificazioni morfologiche, le vescicole ottiche non hanno superato la condizione di coppa ottica appena introflessa e il cristallino la condizione di sacchetto aperto (Tav. II, fig. 1). Similmente le vescicole otiche hanno avuto un limitato sviluppo, sebbene talvolta si siano formati dei piccoli sacchetti chiusi (Tav. II, fig. 3), ma si è anche riscontrato il caso in cui non si è avuta la loro formazione. In un embrione trattato per 48 ore con NaSCN 0,0123 M le vescicole otiche sono venute a contatto fra di loro per la completa degenerazione dell'interposto neurasse.

Il cuore, in genere unico, ha avuto un accrescimento abbastanza proporzionale con la mole dell'individuo trattato. Negli individui trattati per 48 ore con NaSCN 0,0123 M e 0,0246 M l'aorta ventrale e le radici dell'aorta dorsale non sono più individuabili, in quanto si è formata un'unica ampia cavità comunicante con il cuore (Tav. II, figg. 1, 2, 3), talvolta duplice, che nella parte posteriore dell'embrione si continua con le due aorte caudali molto dilatate (Tav. II, fig. 4).

Frequenti sono le mancanze di parti della corda dorsale sotto il cervello cordale, tanto dopo un trattamento di 6 ore che di 48 ore con NaSCN 0,0123 M. Trattando gli embrioni con NaSCN 0,0246 M si è osservato che anche sotto il midollo spinale possono mancare parti della corda dorsale, che in un caso è risultata completamente mancante. I somiti degli individui trattati spesso sono numericamente uguali a quelli dei controlli (ciò è facilmente visibile negli embrioni fissati subito dopo il trattamento di 6-12-24 ore), sebbene il loro accrescimento sia minore. Negli individui trattati per 48 ore è difficile la identificazione dei somiti, poiché l'embrione risulta gravemente malformato. In ogni caso l'intestino anteriore si è sviluppato a forma di tubo, generalmente schiacciato: si è constatato però che in tutti gli embrioni trattati con NaSCN

0,0246M e successivamente riportati nel mezzo standard, l'intestino anteriore ha subito un notevole arresto dello sviluppo, in quanto non si sono formate differenziazioni morfologiche specifiche.

Negli embrioni trattati per 6 ore con NaSCN 0,0246M e riportati nel mezzo standard, si nota che negli spazi fra gli organi vi è una trama di cellule mesenchimatiche simile a quella del controllo; negli embrioni trattati con la stessa dose per 12 e 24 ore e riportati nel mezzo standard, si osserva che con la riduzione della morfogenesi dell'individuo vi è anche una inibizione dello sviluppo del mesenchima; negli embrioni trattati per 48 ore (sia con NaSCN 0,0123 che 0,0246M), si osserva che con lo sviluppo della cavità ripiena di liquido comunicante con il cuore, il mesenchima risulta completamente spostato alla periferia e il numero degli elementi cellulari è considerevolmente scarso.

Trattamenti allo stadio di linea primitiva (stadi 3+ e 4).

Attualmente sono stati studiati solo tre embrioni trattati per 24 ore con NaSCN 0,0246M e fissati subito dopo il trattamento e si è constatato che nell'embrione si è formato essenzialmente il cervello, mentre manca o è scarso il midollo spinale. Il cervello è formato da tre vescicole, di cui solo la prima è chiusa, mentre il rimanente tubo neurale può presentare un abbozzo delle pieghe neurali. Presente è l'abbozzo delle vescicole ottiche, mancano il cristallino, le otocisti, i somiti e la corda dorsale. Scarsissimo è il differenziamento del mesenchima. Rudimentale è l'intestino anteriore, mentre il cuore è unico nella parte distale e duplice in quella prossimale. Non vi è traccia delle aorte ventrale e dorsale.

DISCUSSIONE.

I dati della presente ricerca hanno dimostrato che il NaSCN ha provocato l'inibizione dello sviluppo degli embrioni di pollo trattati allo stadio di linea primitiva e di processo cefalico e che gli organi embrionali hanno avuto una risposta differenziale rispetto all'azione tossica del tiocianato. Negli embrioni trattati allo stadio di processo cefalico particolarmente colpita è stata la regione medio-posteriore del cervello e della parte anteriore del midollo spinale, mentre la regione prosencefalica e quella tronco caudale del midollo spinale hanno avuto un miglior sviluppo. Il tiocianato ha avuto inoltre un notevole effetto sulla corda dorsale, il cui sviluppo è stato parzialmente o totalmente inibito. La morfogenesi del cuore non è stata sensibilmente compromessa, mentre lo sviluppo dell'aorta ventrale e delle radici delle aorte dorsali è stato ritardato e gravemente alterato.

Queste inibizioni dello sviluppo si sono manifestate in modo ancora più grave negli embrioni trattati allo stadio di linea primitiva, dove è stato inibito lo sviluppo della corda dorsale, dei somiti, di gran parte del midollo spinale, e il cuore ha avuto un differenziamento incompleto. Ciò sta a dimostrare che il NaSCN inibisce maggiormente lo sviluppo degli organi meno differenziati,

e con effetto differente anche nell'ambito dei tessuti di uno stesso organo, come si è constatato per esempio nel sistema nervoso.

Gli embrioni che hanno subito un prolungato trattamento, invece dell'aorta ventrale e di quella dorsale, si è formata un'ampia cavità comunicante con il cuore, che con la sua pressione e continua estensione agisce meccanicamente danneggiando le strutture dell'embrione, tanto che nel sistema nervoso la regione media-posteriore del cervello e la parte anteriore del midollo spinale, già alterate dal tiocianato, vengono ulteriormente malformate e separate.

Dall'esame comparativo di tutti i casi presi fino ora in esame, appare che il NaSCN abbia provocato un'inibizione dello sviluppo del mesenchima, particolarmente evidente negli embrioni trattati allo stadio di linea primitiva; negli embrioni trattati allo stadio di processo cefalico, questo effetto è minore, ma la riduzione del mesenchima aumenta prolungando la durata del trattamento.

È noto che negli Anfibii il NaSCN provoca alterazioni della morfogenesi della corda dorsale che, oltre a ripiegarsi e a deformarsi, può penetrare nel cervello estendendosi oltre il confine dell'infundibolo diencefalico (Ranzi, Tamini e Storari-Offer 1946 [5], Corti 1950 [6], Rossi 1964 [8]). Dalle presenti esperienze risulta che nel pollo il NaSCN non provoca alterazioni simili a quelle degli Anfibii, ma può causare invece l'inibizione sia totale che parziale del suo sviluppo.

Iniziando il trattamento a stadi precedenti alla gastrula, il NaSCN provoca in embrioni di *Bufo bufo* casi di monorinia, di tendenza alla sinoftalmia e di avvicinamento delle otocisti sotto il neurasse, in seguito all'inibizione del cervello e dei substrati cordale e precordale (Rossi 1964 [8]). Nel pollo il NaSCN, pur avendo inibito lo sviluppo del neurasse, non ha provocato fenomeni di ciclopia, mentre in un embrione, a causa della completa degenerazione della regione mielencefalica, le vescicole otiche sono venute a diretto contatto fra loro.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. RUNNSTRÖM, *Plasmabau und determination bei dem ei von Paracentrotus lividus Lk.*, « Arch. Entw. mech. », 113, 556 (1928).
- [2] P. E. LINDAHL, *Zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Determination im Seeigelkeim*, « Acta Zool. », 17, 179 (1936).
- [3] S. RANZI, *Ricerche sulle basi fisiologiche della determinazione negli embrioni degli Echinodermi. - II. Influenza del solfocianuro.* « Arch. Zool. Ital. », 26, 427 (1939).
- [4] S. RANZI e E. TAMINI, *Azione del NaSCN sullo sviluppo di embrioni di Anfibii. - I. Azione su embrioni in toto*, « Rend. Ist. Lomb. Sci. e Lett. », 75, 697 (1942).
- [5] S. RANZI, E. TAMINI e E. STORARI-OFFER, *Alterazioni dello sviluppo embrionale di Anfibii prodotte da solfocianato e da altre sostanze*, « Rend. Ist. Lomb. Sci. e Lett. », 79, 161 (1946).
- [6] C. CORTI, *Ricerche sull'ipersviluppo della corda e iperinduzione degli Anfibii*, « Riv. Biol. » 42, 443 (1950).
- [7] S. RANZI e G. GAVAROSI, *Dimensions of the notochord and somites in embryos of Xenopus laevis treated with thiocyanate*, « J. Embryol. exp. Morph. », 7, 117 (1959).

- [8] A. ROSSI, *Effetto del tiocianato di sodio sullo sviluppo di Bufo bufo*, « Rend. Ist. Sci. Univ. Camerino », 5, 151 (1964).
- [9] K.T. ROGERS, *Radioautographic analysis of the incorporation of protein and acid precursors into various tissues of early chick embryos cultured in toto on medium containing LiCl*, « Dev. Biol. », 9, 176 (1964).
- [10] G. NICOLET, *Action du LiCl sur de jeunes blastoderms de poulet cultivés in vitro*, « Experimentia », 17, 413 (1961).
- [11] K. T. ROGERS, *Experimental production of perfect cyclopia in the chick by means of LiCl, with a survey of the literature on cyclopia produced experimentally by various means* « Dev. Biol. », 8, 129 (1963).
- [12] A. R. BEAUDOUIN and J. G. WILSON, *Teratogenic effect of trypan blue on the developing chick*, « Proc. Soc. Exper. Biol. Med. », 97, 85 (1958).
- [13] L. MULHERKAR, *The effects of trypan bleu on chick embryos cultured in vitro* « J. Embryol. exp. Morph. », 8, 1 (1960).
- [14] F. STEPHAN et B. SUTTER, *Action du bleu trypan sur la différenciation du mésoderme axial chez l'embryon de Poule*, « C.R. Soc. Biol. », 154, 1620 (1960).
- [15] R. LANOT, *Action du bleu trypan sur les cellules du jeune embryon de Poulet* « C. R. Soc. Biol. », 157, 1049 (1963).
- [16] W. LANDAUER, *Malformations of chicken embryos produced by boric acid and the probable role of riboflavin in their origin*, « J. Exp. Zool. », 120, 469 (1952).
- [17] W. LANDAUER and C. I. BLISS, *Insulin-induced rumplessness of chickens. - III The relationship of dosage and of developmental stage at time of injection to response* « J. Exp. Zool. », 102, 1 (1946).
- [18] W. LANDAUER, *Insulin-induced abnormalities of beak extremities and eyes in chickens*, « J. Exp. Zool. », 105, 145 (1947).
- [19] W. LANDAUER, *Insulin-induced rumplessness of chickens. - V. The effect of insulin on the axial skeleton of chicks and adult fowl*, « J. Exp. Zool. », 105, 317 (1947).
- [20] P. BARRON and MCKENZIE, *The inhibitory action of insulin in the early chick embryo*, « J. Embryol. exp. Morph. », 10, 88 (1962).
- [21] W. LANDAUER, *Nicotine-induced malformations of chicken embryos and their bearing on the phenocopy problem*, « J. Exp. Zool. », 143, 107 (1960).
- [22] M. L. GABRIEL, *The effect of local applications of colchicine on leghorn and polydactylous chick embryos*, « J. Exp. Zool. », 101, 339 (1946).
- [23] J. OVERTON, *Effects of colchicine on the early chick blastoderm*, « J. Exp. Zool. » 139, 329 (1958).
- [24] L. I. PIERRO, *Teratogenic action of actinomycin D in the embryonic chick. - II. Early development*, « J. Exp. Zool. », 148, 241 (1961).
- [25] G. BEVELANDER, H. NAKAHARA and G. K. ROLLE, *Effect of tetracycline on the development of the skeletal system of the chick embryo*, « Develop. Biol. », 2, 298 (1960).
- [26] C. A. DE BOCK and A. PETERS, *Effect of thalidomide on the development of the chick embryo*, « Nature », 199, 1204 (1963).
- [27] P. ANCEL, *Recherches sur l'action tératogène du refroidissement temporaire de l'oeuf de Poule au cours de l'incubation*, « J. Embryol. exp. Morph. », 6, 335 (1958).
- [28] N. T. SPRATT, *Development in vitro of the early chick blastoderm explanted on yolk and albumen extract saline agar substrata*, « J. Exp. Zool. », 106, 345 (1947).
- [29] D.A.T. NEW, *A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro*, « J. Embryol. Exp. Morph. », 3, 320 (1955).
- [30] E. HOWARD, *Some effects of NaCl concentration on the development of early chick blastoderms in culture*, « J. Cell. Comp. Phis. », 41, 237 (1953).
- [31] H. L. HAMILTON, *Lillie's development of the chick. An introduction to embryology*, Editore da Henry Holt and Company, New York (1952).

SUMMARY. — Chick embryos (White Leghorn) of primitive-streak and head-process were bred *in vitro* with 0,0123 M and 0,0246 M solutions of NaSCN for varying period of time (6-12-24-48 hs.). Some embryos at the stage of head-process were transferred into the standard culture medium after the treatment with 0,0246 M NaSCN for 6-12-24 hs., and left there until they reached the 48 hs. of breeding.

1) - The embryos treated at the stage of head-process showed a better development than the embryos treated at stage of primitive-streak with the same dose of NaSCN (0,0246 M) and for the same length of time.

2) - The treatment with NaSCN caused in the embryos of both stages, primitive-streak and head-process, an evident arrest in the body development.

3) - In the embryos at the stage of primitive-streak a rudimental nervous system developed, partially or totally lacking the spinal chord. Notochord and somites were absent, the mesenchima was reduced and the heart was partially double.

4) - All the organs of the embryos treated at the stage of head-process presented malformations variable according to the dose and the length of treatment; the neuraxis, the eyes, the lens and the ears showed an early arrest in their differentiation. The middle hind-brain and the anterior part of the chord are frequently degenerated and damaged.

The somites had formed but the notochord could be partially or totally lacking. The development of the mesenchima was inhibited; after a treatment for 48 hs. with NaSCN it appeared greatly reduced owing to the formation of a large cavity communicating with the heart, which was morphologically single. Also the fore gut had formed but without specific differentiations.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

Figg. 1, 2, 3. - Esempi di embrioni di pollo trattati allo stadio di processo cefalico rispettivamente per 6-12-24 ore con NaSCN 0,0246 M e riportati nel mezzo di cultura standard rispettivamente per 42-36-24 ore.

Fig. 4. - Embrione di pollo trattato allo stadio di processo cefalico per 48 ore con NaSCN 0,0246 M.

Fig. 5. - Controllo di embrione di pollo allevato per 48 ore a partire dallo stadio di processo cefalico.

Tutti gli embrioni sono stati fotografati allo stesso ingrandimento.

TAVOLA II.

Figg. 1-4. - Sezioni seriate di uno stesso embrione di pollo trattato allo stadio di processo cefalico per 48 ore con NaSCN 0,0246 M. Nell'embrione si è formata una ampia cavità, il sistema nervoso si è scarsamente differenziato e presenta zone di estesa degenerazione nel cervello medio e posteriore, inoltre è assente la corda dorsale (figg. 1, 2, 3). Nella regione caudale dell'embrione sono presenti il midollo spinale e la corda dorsale, mentre le aorte caudali sono notevolmente dilatate.

Figg. 5-8. - Sezioni seriate di un embrione di pollo di controllo allevato per 48 ore a partire dallo stadio di processo cefalico.

Didascalie: a = atrio; ac = aorta caudale; aci = arteria carotide interna; ad = aorta dorsale; c = cuore; cr = cristallino; cd = corda dorsale; cm = cervello medio; d = diencefalo; f = faringe; i = intestino; me = mesencefalo; mi = mielencefalo; n = neurasse; ot = otocisti; p = prosencefalo; tb = tasca branchiale; v = ventricolo; vo = vescicola ottica.

Tutte le fotografie sono state fatte allo stesso ingrandimento.



