
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALDO ROSSI, SERGIO FILONI, GIANNA MARIA BARTOLI

Effetto del tiocianato di sodio sullo sviluppo dell'embrione di pollo. Trattamenti in ovo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.2, p. 313–320.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_2_313_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. — *Effetto del tiocianato di sodio sullo sviluppo dell'embrione di pollo. Trattamenti in ovo*^(*). Nota di ALDO ROSSI, SERGIO FILONI e GIANNA MARIA BARTOLI, presentata ^(**) dal CORRISP. A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Solutions of NaCNS at different molarities were injected into batches of White Leghorn eggs after 1, 2, 3 and 4 days of incubation; controls were prepared by injection of NaCl solutions at the same molarities. The chicks were killed after 19 days of incubation.

The research has brought to the following results:

1) The *in ovo* injection of thiocyanate produces no peculiar malformations, but a general inhibition of growth.

2) The solutions of NaCNS at concentration higher than 0,4 M are lethal for all individuals, from the seventh day of incubation onward. The 0,4 M and 0,2 M solutions produce a higher percentage of mortality than that of the controls; this difference in mortality is significant only in those batches of eggs which had been injected after one and three days of incubation.

3) In the treated embryos, ponderal and metrical analysis have made evident a significant decrease of weight and length, compared with those of controls.

4) The NaCNS has raised the average percentage of shrunken phalanxes of the hind limbs, among the treated embryos.

È noto che il tiocianato di sodio determina l'animalizzazione delle uova di riccio di mare (Runnström, 1928 [1]; Lindahl, 1936 [2]; Ranzi, 1939 [3]) e negli Anfibi provoca un complesso di arresti di sviluppo particolarmente evidenti a carico del sistema nervoso centrale e della corda dorsale (Rossi, 1964 [4]; Rossi e Palombi, 1965 [5]); quest'ultima si modifica notevolmente nella sua struttura e presenta ripiegamenti e protrusioni nei tessuti circostanti (Ranzi, Tamini e Storari-Offer, 1946 [6]; Corti, 1950 [7]; Ögi, 1957 [8]; Ranzi e Gavarosi, 1959 [9]).

In una precedente ricerca, uno di noi (Rossi, 1965, in collaborazione con Jorquera [10]) ha studiato l'azione del NaCNS sullo sviluppo dell'embrione di pollo, al fine di determinare se anche in questo vertebrato si manifestino le stesse anomalie che si riscontrano trattando gli embrioni di Anfibi.

È risultato che l'embrione di pollo (livornese bianca) allo stadio di linea primitiva e di processo cefalico trattato *in vitro* con soluzioni molari di NaCNS, presenta frequenti degenerazioni e malformazioni a carico del sistema nervoso e della corda dorsale che però non sono comparabili a quelle osservate negli Anfibi; inoltre è risultato inibito anche lo sviluppo del mesenchima e

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma, con i contributi del Centro di Neuroembriologia del C.N.R. e del gruppo di ricerca, per lo studio del differenziamento, del C.N.R.

(**) Nella seduta del 12 febbraio 1966.

del sistema vascolare con conseguente formazione di cavità edematiche che aumentano le alterazioni degli animali trattati.

Volendo ulteriormente estendere tali ricerche, nel presente lavoro si sono trattate uova di pollo iniettando nel sacco del tuorlo soluzioni molari scalari di NaCNS. Ricercatori precedenti (Naz e Rulon 1946, [11]) hanno iniettato da 0,25 a 4 ml di soluzione di LiCl e di NaCNS in uova di livornese bianca incubate per 24, 48, 72 e 76 ore. In seguito al trattamento gli embrioni hanno presentato inibizioni della testa, dei somiti e del cuore, che talvolta presenta una parziale o totale duplicazione; tali Autori non hanno precisato la molarità del tiocianato con cui hanno ottenuto tali anomalie.

Nella presente ricerca si è definita, *in ovo*, sia la soglia di mortalità in rapporto alla concentrazione molare di questo sale, sia il suo effetto tossico sul differenziamento e sull'accrescimento dell'embrione.

MATERIALE E METODO.

In lotti di 20-40 uova di livornese bianca sono state iniettate soluzioni di NaCNS in acqua bidistillata a concentrazione molare decrescente.

Sono stati iniettati nel sacco del tuorlo 0,1 ml di soluzioni molari di tiocianato 1,6 M, 0,8 M, 0,4 M, 0,2 M. Le iniezioni sono state praticate dopo 1-2-3-4 giorni di incubazione. I controlli sono stati iniettati con 0,1 ml di NaCl equimolecolare alle rispettive soluzioni molari di NaCNS. Gli embrioni sono stati presi in esame dopo diciannove giorni di incubazione.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Nella prima parte dell'esperienza si è determinata la dose molare di tiocianato, che iniettata nel sacco del tuorlo dopo 24 ore di incubazione non fosse mortale per tutti gli embrioni trattati. È risultato che 0,1 ml di NaCNS 0,8 M è mortale per tutti gli individui già dopo una settimana di incubazione. Diversamente il 70% dei controlli, trattati con una soluzione equimolecolare di NaCl, ha raggiunto la schiusa e si sono sviluppati normalmente.

Iniettando 0,1 ml di NaCNS 0,4 M e 0,2 M, la mortalità degli individui trattati è rispettivamente del 72% e del 47,5%. La mortalità dei rispettivi controlli, trattati con soluzioni equimolecolari di NaCl, è stata rispettivamente del 30% e del 40% (fig. 2 e Tabella II).

Pertanto, avendo stabilito la soglia di mortalità delle soluzioni molari di tiocianato, sono stati iniettati 0,1 ml di NaCNS 0,4 M dopo 2-3-4 giorni di incubazione al fine di stabilire se ci fosse una sensibilità differenziale al NaCNS in rapporto allo stadio di sviluppo.

Al diciannovesimo giorno di incubazione è risultato che la mortalità degli individui trattati al secondo, terzo e quarto giorno di incubazione era rispettivamente del 60%, 74% e 38%. I controlli, trattati con una soluzione equi-

molecolare di NaCl, presentavano rispettivamente una mortalità del 33,4%, 39%, 20% (fig. 2 e Tabella II).

Il calcolo del χ^2 (in tabelle 2×2) ha messo in evidenza che la differenza delle percentuali di mortalità dei trattati con NaCNS 0,4 M e dei rispettivi controlli, è significativa solo quando l'iniezione è stata praticata dopo uno e tre giorni di incubazione (fig. 3 e Tabella II). Non significativa è risultata invece la differenza tra le percentuali di mortalità dei trattati con 0,1 ml di NaCNS 0,2 M e dei relativi controlli. L'insieme di questi dati è riportato nella Tabella II e nelle figg. 1 e 2.

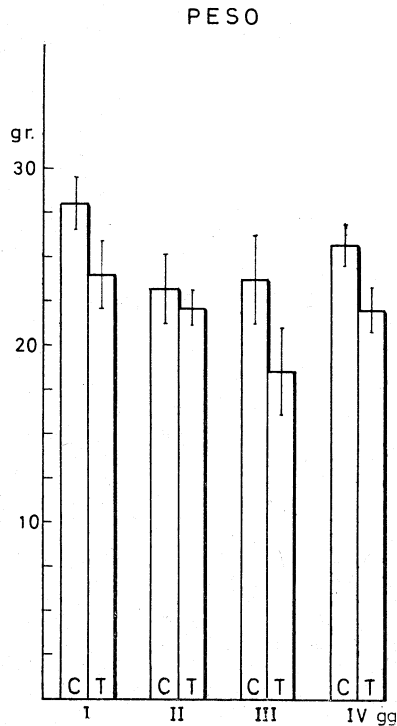


Fig. 1. - Grafico dei valori medi, con i relativi limiti fiduciali, del peso espresso in grammi dei pulcini trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCNS 0,4 M (T), e dei relativi controlli trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCl equimolecolare (C) iniettata nel sacco del tuorlo dopo 1, 2, 3, 4 giorni di incubazione.

Tra gli animali trattati si è osservato frequentemente che le dita degli arti posteriori sono rattrappite. La percentuale di tale anomalia è stata dell'11% tra gli individui trattati con NaCNS 0,4 M dopo 1-2-3-4 giorni di incubazione, e del 47,6% fra gli individui trattati con NaCNS 0,2 M dopo un giorno di incubazione. Tra i controlli degli individui trattati con soluzione 0,4 M, il 2% presentavano tale anomalia, mentre nessun caso si è avuto tra quelli trattati con soluzioni di NaCl 0,2 M. Dall'esame radiologico è risultato che tale anomalia non è da attribuirsi a modificazioni della struttura scheletrica.

TABELLA I.

Molarità	PESO (gr.)											
	0,4						0,2					
	I		II		III		IV		I		T	
Giorni	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Media	27,99	24,01	23,22	22,14	23,76	18,55	25,72	22,05	28,35	26,20		
Lim. fd.	$\pm 1,51$	$\pm 1,92$	$\pm 1,99$	$\pm 0,93$	$\pm 2,52$	$\pm 2,52$	$\pm 1,23$	$\pm 1,27$	$\pm 1,45$	$\pm 0,73$		
t Student	3,62		1,21		3,18		3,47		3,16			
Probabilità	$P < 0,01$		$P > 0,05$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$			
Casi	14	11	11	20	11	13	12	31	12	20		

TABELLA II.

Molarità	MORTALITÀ											
	0,4						0,2					
	I		II		III		IV		I		T	
Giorni	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
%	30	72	33,4	60	39	74	20	38	40	47,5		
χ^2	8,23		2,20		5,69		0,96		0,078			
casi } morti	6	29	6	30	7	37	3	19	8	19		
vivi	14	11	11	20	11	13	12	31	12	21		

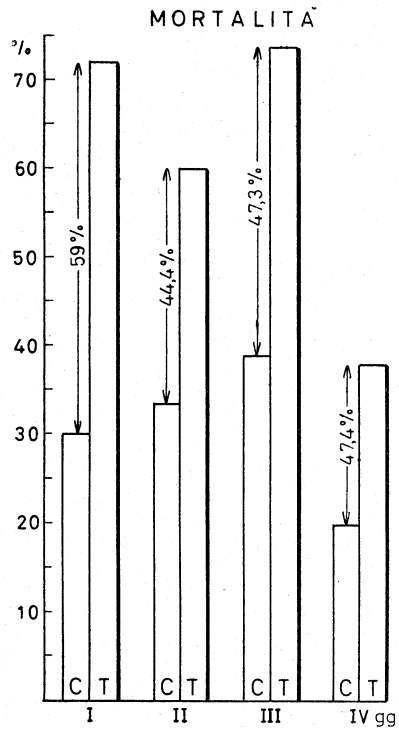


Fig. 2. - Grafico delle percentuali di mortalità dei pulcini trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCNS 0,4 M (T) e dei rispettivi controlli (C) trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCl equimolecolare iniettata nel sacco del tuorlo dopo I, 2, 3, 4 giorni di incubazione.

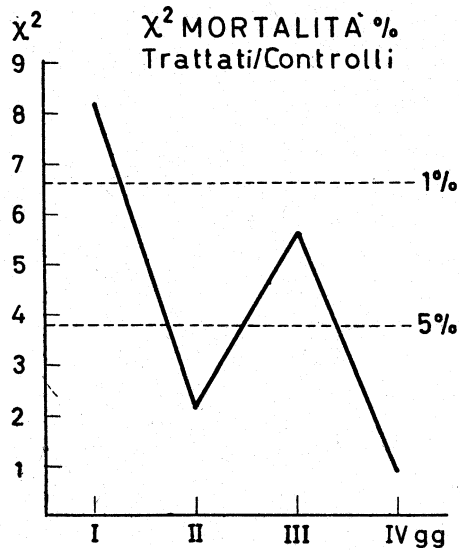


Fig. 3. - Grafico delle percentuali di mortalità dei trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCNS 0,4 M e dei relativi controlli, trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCl equimolecolare.

Gli individui trattati con NaCNS 0,4 M e 0,2 M presentano una significativa diminuzione di peso (tranne nel lotto di individui trattati con 0,1 ml di NaCNS 0,4 M dopo due giorni di incubazione) (fig. 1 e Tabella I). Tale riduzione di peso è dovuta ad un minore accrescimento di tutto l'animale. Nel lotto trattato con NaCNS 0,2 M, dove è risultata più alta la percentuale di casi di rattrappimento delle dita dell'arto posteriore, si è misurata la lunghezza dell'intero animale prendendo come punti di riferimento l'estremità del becco e del pigostilo, e la lunghezza rispettivamente dello zeugopodio e del basipodio. La lunghezza dell'intero animale, dello zeugopodio e del basipodio è significativamente minore rispetto a quella dei controlli. Tuttavia la riduzione dello zeugopodio e del basipodio è risultata proporzionale alla riduzione della lunghezza totale degli animali trattati.

DISCUSSIONE.

I risultati della presente ricerca dimostrano che la soglia di mortalità totale del tiocianato iniettato in ragione di 0,1 ml nel sacco del tuorlo, si trova tra le soluzioni 0,8 M e 0,4 M.

Alla concentrazione 0,8 M di NaCNS tutti gli individui trattati muoiono, mentre i controlli, trattati con 0,1 ml di una soluzione equimolecolare si sviluppano normalmente, pur presentando una mortalità del 70%. Diversamente, iniettando 0,1 ml di una soluzione 0,4 M di NaCNS dopo 1-2-3-4 giorni di incubazione, si osserva che il confronto delle percentuali di mortalità tra i trattati e i controlli (iniettati con 0,1 ml. di una soluzione di NaCl equimolecolare) è risultato significativo solo nei lotti di uova inoculati dopo uno e tre giorni di incubazione. Non significativa è risultata invece la differenza delle percentuali di mortalità tra gli individui di controllo e quelli trattati con 0,1 ml di una soluzione di NaCNS 0,2 M dopo un giorno di incubazione, anche se la mortalità di questi ultimi è risultata numericamente più elevata di quella dei controlli.

L'azione tossica del tiocianato sull'embrione di pollo trattato *in ovo* è comprovata anche dalla significativa diminuzione di accrescimento degli individui trattati che si è rivelata dall'analisi ponderale e metrica. Inoltre vi è un aumento della percentuale dei casi di arti posteriori che presentano falangi rattrappite (Tav. I, figg. 1 e 3). Tale anomalia, che l'esame radiologico ha dimostrato non essere dipendente da un'alterazione degli elementi scheletrici, (Tav. I, figg. 2-4), si è riscontrata in bassa percentuale (2%) negli individui di controllo, trattati con NaCl 0,4 M, e in nessun caso di quelli trattati con NaCl 0,2 M. È noto che tale anomalia si riscontra con una percentuale estremamente bassa anche nei lotti di uova che non hanno subito alcuna azione traumatica (1,4‰, secondo i dati ottenuti dal Centro Avicolo di Roma). Il fatto che fra gli animali trattati con NaCNS vi sia una percentuale più alta di individui con questa anomalia (in particolare più alta negli individui trattati con NaCNS 0,2 M che non in quelli trattati con NaCNS 0,4 M) rispetto

a quella riscontrata nei controlli in cui si sono iniettati 0,1 ml di NaCl equimolare, fa supporre che la sostanza tossica, inibendo il metabolismo dell'embrione, favorisca questa latente tendenza alla formazione di arti subnormali.

In conclusione, dall'insieme di questi dati risulta che il tiocianato iniettato *in ovo*, determina una generale inibizione dello sviluppo che si manifesta sia con l'aumento della mortalità, sia con il diminuito accrescimento dei trattati, senza tuttavia provocare particolari anomalie in organi specifici. Tuttavia l'analisi dei controlli trattati con soluzioni equimolecolari di NaCl iniettate in egual quantità, dimostra che, alla specifica azione tossica esercitata dal tiocianato, si somma l'effetto traumatico provocato dalla perforazione del tuorlo, e dalla immissione di un determinato quantitativo di soluzione salina. Che l'effetto traumatico abbia un effettivo valore, risulta dal comportamento della curva di mortalità dei controlli che si è spostata insieme a quella dei trattati, sebbene con valori quantitativamente inferiori.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. RUNNSTROM, *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*, « Arch. Zool. Ital. », 26, 427 (1939).
- [4] A. ROSSI, *Effetto del tiocianato di sodio sullo sviluppo di Bufo bufo*, « Rend. Ist. Sci. Camerino », 5, 151 (1964).
- [5] A. ROSSI e F. PALOMBI, *Sull'azione del tiocianato di sodio nello sviluppo della corda dorsale di un Anfibio anuro (Bufo bufo L.)*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » [in corso di stampa, vol. 39], (1965).
- [6] S. RANZI, E. TAMINI e E. STORARI-OFFER, *Alterazioni dello sviluppo embrionale di Anfibi prodotte da solfocianato e da altre sostanze*, « Rend. Ist. Lomb. Sci. e Lett. », 79, 1, 161 (1946).
- [7] C. CORTI, *Ricerche sull'ipersviluppo della corda e iperinduzione degli Anfibi*, « Riv. Biol. » (Perugia), 42, 443 (1950).
- [8] K. I. ÖGI, *Influence of sodium iodide and sodium thiocyanate upon the development of frog's embryos*, « Embryologia », 3, 221 (1957).
- [9] 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).
- [10] B. JORQUERA e A. ROSSI, *Sull'azione del tiocianato di sodio nello sviluppo dell'embrione di pollo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII 38, 938 (1965).
- [11] J. F. NAZ e O. RULON, *Modification of development in the chick with LiCl and NaCNS*, « Anat. Rec. », 96, 555 (1946).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Esempio di rattrappimento delle falangi dell'arto posteriore di un pulcino trattato con 0,1 ml di una soluzione di NaCNS 0,2 M iniettata nel sacco del tuorlo dopo 24 ore di incubazione.
- Fig. 2. - Radiografia dello stesso pulcino. Non si notano particolari anomalie a carico dello scheletro, e in particolare dell'arto posteriore.
- Fig. 3. - Pulcino di controllo, trattato con 0,1 ml. di una soluzione di NaCl 0,2 M iniettata nel sacco del tuorlo dopo 24 ore di incubazione.
- Fig. 4. - Radiografia del controllo.

