
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

HARRY MANELLI, E. GRASSI-MILANO, F. ACCORDI, L.
MASTROLIA

**Sulla comparsa delle reazioni al bicromato e allo
iodato di potassio nelle cellule adrenali della
surrenale di *Rana esculenta* e di *Bufo bufo*, durante
lo sviluppo embrionale e la metamorfosi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.3-4, p.
288-292.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_3-4_288_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 dello sviluppo. — *Sulla comparsa delle reazioni al bicromato e allo iodato di potassio nelle cellule adrenali della surrenale di Rana esculenta e di Bufo bufo, durante lo sviluppo embrionale e la metamorfosi* (*). Nota (**) di HARRY MANELLI, E. GRASSI-MILANO, F. ACCORDI e L. MASTROLIA, presentata dal Socio P. PASQUINI.

SUMMARY. — The chromaffine reaction is positive in *Rana esculenta* at the end of premetamorphic period, while the iodate reaction appears only during prometamorphic period.

In *Bufo bufo*, instead, both these reactions appear later: the chromaffin during the prometamorphic stages and the iodate reaction at the end of metamorphosis.

La comparsa della reazione cromaffine nel tessuto adrenale della surrenale degli Anfibi durante lo sviluppo costituisce un interessante argomento di ricerca nel quadro dello studio delle correlazioni endocrine in questa classe di Vertebrati, soprattutto alla luce di alcuni recenti dati sperimentali (Axelrod, 1962; Axelrod e Wurtman, 1965; Pohorecki e Wurtman, 1968; Wasserman e Bernard, 1971; Manelli e Mastrolia, 1970 e Manelli, Accordi, Grassi e Mastrolia, 1973) secondo i quali, almeno nei Mammiferi e negli Uccelli, il processo di metilazione che trasforma la noradrenalina in adrenalina sarebbe regolato dai corticosteroidi e quindi, indirettamente, dall'ipofisi.

Ci è sembrato quindi opportuno esaminare il momento della comparsa di queste catecolamine, indicato dalla positività della reazione citoplasmatica al bicromato e allo iodato di potassio, secondo il metodo di Hillarp e Hökfelt (1955), in due specie di Anuri appartenenti a generi diversi: *Rana esculenta* e *Bufo bufo*.

L'ossidazione in bicromato o in iodato di potassio (seguita da rapida inclusione in paraffina e da colorazione delle sezioni con carmallume) che permette di mettere in evidenza le cellule cromaffini totali (reazione al bicromato) o le sole cellule a noradrenalina (reazione allo iodato), è stata eseguita su vari stadi embrionali e larvali di *Rana* (tavole di sviluppo di Manelli e Margaritora, 1961) e di *Bufo* (tavole di sviluppo di Rossi, 1958) fino al termine della metamorfosi.

È opportuno precisare che con l'espressione « cellula cromaffine » si intende, secondo la definizione di Coupland (1965) « un elemento derivato dal neuroectoderma, innervato da fibre nervose pregangliari, capace di sintetizzare catecolamine e di metterle in riserva in quantità sufficiente per dare

(*) Dall'Istituto di Zoologia della Università di Roma, diretto dal prof. Harry Manelli.

(**) Pervenuta all'Accademia il 10 ottobre 1973.

una reazione positiva con le soluzioni acquose di bicromato e di cromato di potassio». In questo lavoro si prenderanno in considerazione soltanto le cellule che corrispondono alle caratteristiche della definizione precedente e che si trovano nella surrenale, escludendo quindi le cellule cromaffini extradrenali.

Circa il differenziamento delle cellule adrenali o cromaffini, è noto che i cordoni di cellule corticali surrenalici, già presenti nelle larve degli Anfibi al momento dell'opercolazione delle branchie (Witschi e Dale, 1962) vengono più tardi invasi da cellule neuroectodermiche, i simpatoblasti, derivate da gangli disposti lungo il ramo discendente dell'aorta, che si differenzieranno in cellule adrenali. Questo processo, nelle due specie di Anuri presi in esame, avviene con modalità analoghe, ma con notevoli differenze cronologiche, soprattutto riguardo al momento della comparsa di una netta reazione allo iodato di potassio. Pertanto esamineremo separatamente *Rana* e *Bufo*.

a) *Rana esculenta*. Durante il periodo embrionale, fino allo stadio 31 compreso, non si osservano cellule positive al bicromato, le quali si mettono in evidenza in modo netto a partire dallo stadio 32, corrispondente, secondo la definizione di Etkin (1968), alla fine della premetamorfosi. In questo periodo dello sviluppo le cellule cromaffini, isolate fra loro, non più di 7-8 in ogni sezione trasversale della surrenale, si trovano sulla superficie dorso-mediale dei mesonefri; l'intensità della reazione cromaffine è molto variabile e le caratteristiche morfologiche delle cellule che la presentano, cioè il citoplasma scarsamente colorabile ed il nucleo piuttosto grande, di forma sferica od ovoidale, indicano che nella maggior parte dei casi si tratta di elementi scarsamente differenziati. Nel corso della prometamorfosi le cellule cromaffini cominciano a raggrupparsi e a migrare sulla faccia ventro-mediale dei mesonefri; prosegue anche il differenziamento citologico: allo stadio 38 si osserva infatti che la maggior parte delle cellule positive ai sali di cromo presenta le caratteristiche degli elementi completamente differenziati e cioè nucleo sferico, citoplasma intensamente eosinofilo; la struttura della ghiandola è ormai quella tipica degli adulti, costituita da cordoni anastomizzati di cellule corticali, tra i quali si trovano piccoli gruppi di cellule cromaffini. Il differenziamento citologico ed istologico procede regolarmente durante il restante periodo prometamorfico e durante il *climax*; anche il numero delle cellule cromaffini va gradualmente aumentando. Al termine della metamorfosi (stadio 50) la surrenale della rana presenta già tutte le caratteristiche della ghiandola adulta.

La reazione allo iodato, che permette di mettere in evidenza le cellule a noradrenalina, compare in modo evidente solo allo stadio 38. Agli stadi precedenti, infatti, solo poche cellule presentano una lieve colorazione giallastra, che non è possibile attribuire con sicurezza ad un'affinità per lo iodato. Durante i successivi stadi della metamorfosi le cellule a noradrenalina aumentano di numero e alla fine di questo processo presentano caratteristiche morfologiche simili in tutto a quelle degli adulti.

b) *Bufo bufo*. La reazione cromaffine si presenta debolmente positiva solo a partire dallo stadio II, cioè a prometamorfosi già iniziata: a questo stadio però le cellule che si colorano in marrone-giallastro con i sali di cromo sono pochissime e l'intensità della reazione è molto debole; queste cellule sono situate nella regione dorso-mediale dei mesoneftri. Col proseguire della prometamorfosi la reazione cromaffine si fa più intensa e allo stadio VIII è discretamente evidente; in questo periodo le cellule adrenali, insieme con quelle corticali, cominciano ad invadere la regione ventromediale dei mesoneftri. La reazione allo iodato, molto debole negli ultimi stadi della prometamorfosi e durante il *climax*, diviene riconoscibile solo alla fine della metamorfosi, cioè allo stadio XV, quando la ghiandola surrenale raggiunge tutte le caratteristiche morfologiche dell'organo a completo sviluppo.

TABELLA I

		Premetamorfosi	Prometamorfosi	<i>Climax</i>	Metamorfosi completa
<i>Rana</i>	{ Bicromato . . .	+	+ +	+ +	+ +
	{ Iodato	±	+ +	+ +	+ +
<i>Bufo</i>	{ Bicromato . . .	—	+	+	+ +
	{ Iodato	—	±	±	+ +

In questa Tabella vengono indicati schematicamente i periodi dello sviluppo embrionale e metamorfico in cui le cellule adrenali della surrenale di *Rana esculenta* e *Bufo bufo* presentano la reazione ai cromati e allo iodato di potassio. I segni indicano:

—, assenza di reazione; ±, reazione appena visibile; +, reazione positiva; ++, reazione fortemente positiva.

Esaminando i risultati di queste prime ricerche si può osservare come il differenziamento delle cellule adrenali della surrenale di *Rana esculenta* e di *Bufo bufo* avvenga nelle due specie secondo modalità analoghe. Infatti in ambedue le specie compare prima la positività per il bicromato e solo più tardi quella per lo iodato di potassio. Smitten (1963) ha ottenuto risultati analoghi in *Rana arvalis* e *Rana temporaria* e riferisce inoltre che anche in altre specie animali si osserva un comportamento simile (ratto, topo, coniglio). Si deve quindi ammettere che in queste specie si differenziano prima le cellule ad adrenalina e solo in un secondo tempo quella a noradrenalina, mentre, dal punto di vista biochimico, la sintesi di queste catecolamine dovrebbe seguire il cammino inverso.

D'altro canto l'assenza di cellule a noradrenalina durante tutta, o parte, della prometamorfosi in *Rana* e in *Bufo* potrebbe derivare o dalla immediata

metilazione di questa catecolamina, che diventerebbe così adrenalina, oppure dalla sua immissione nel torrente circolatorio non appena viene prodotta dalle cellule, senza che si accumuli in quantità sufficiente per poter essere rivelata dalla reazione allo iodato.

La cronologia del processo di differenziamento della parte adrenale della surrenale di *Rana* e di *Bufo* presenta invece differenze notevoli: infatti nella rana la reazione cromaffine è positiva a partire dalla fine della premetamorfosi, mentre nel rospo lo è solo a prometamorfosi già iniziata. La differenza è ancora più grande per quanto riguarda la reazione allo iodato, che nella rana è già positiva durante la prometamorfosi, mentre nel rospo si mette nettamente in evidenza solo alla fine della metamorfosi.

Allo stato attuale delle nostre ricerche non abbiamo dati e argomenti sufficienti per spiegare la causa di tali differenze, che in via puramente ipotetica si potrebbe far risalire a differenze delle correlazioni endocrine nelle due specie studiate.

Il fatto che le cellule ad adrenalina si mettano in evidenza contemporaneamente (o poco dopo) alla comparsa dell'attività secretoria nelle cellule corticali degli Anfibi (Chieffi, 1955; Witschi e Dale, 1962; Dale, 1962) può ragionevolmente far supporre che esista una correlazione tra l'attività steroidogenica e la sintesi delle catecolamine, anche negli Anfibi, oltre che nei Mammiferi e negli Uccelli, come si è detto nell'introduzione a questa Nota.

Non si ha infine alcun dato sulle correlazioni fra sintesi delle catecolamine e attività dell'ipofisi durante lo sviluppo degli Anfibi, mentre negli adulti sono stati ottenuti risultati contraddittori: infatti Houssay *et al.* (1950) osservano una diminuzione delle due catecolamine, ma soprattutto dell'adrenalina, in *Bufo arenarum*, dopo l'asportazione dell'ipofisi, mentre Burgos (1959) sostiene che l'asportazione dell'ipofisi o la somministrazione di ACTH, in *Rana pipiens*, non hanno alcun effetto sul numero delle cellule ad adrenalina.

BIBLIOGRAFIA

- AXELROD J. (1962) - *Purifications and properties of Phenylethanolamine-N-methyl-transferase*, « J. Biol. Chem. », 237, 1657-1660.
- AXELROD J. e WURTMAN R. J. (1965) - *Adrenaline synthesis control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids*, « Science », 150, 1464-1465.
- BURGOS M. H. (1959) - *Histochemistry and electron microscopy of the three cell types in the adrenal gland of the frog*, « Anat. Rec. », 133, 163-185.
- CHIEFFI G. (1955) - *Contribution to the study of embryonic development*, I. *Histochemical study of the interrenal and the genital ridge in the tadpole of Rana esculenta*, « Riv. Biol. », 47, 439-465.
- COUPLAND R. E. (1965) - *Natural history of chromaffin cells*, London.
- DALE E. (1962) - *Steroid excretions by larval frogs*, « Gen. and Comp. Endocr. », 2, 171-176.
- ETKIN W. (1968) - *Hormonal control of amphibian metamorphosis, from « Metamorphosis: a problem in developmental biology »*, W. Etkin and L. I. Gilbert, N. Y., pp. 314-343.
- HILLARP N. e HÖKFELT B. (1955) - *Histochemical demonstration of noradrenaline and adrenaline in the adrenal medulla*, « J. Histochem. Cytochem. » 3, 1-5.

- HOUSSAY B. A., GERSCHMAN R. e RAFELA C. E. (1950) - *Adrenaline y noradrenaline en la suprarenal del sapo normal o hipofisoprivo*, « Rev. Soc. Arg. Biol. », 26, 29-38.
- MANELLI H., ACCORDI F., GRASSI-MILANO E. e MASTROLIA L. (1973) - *Action of corticosteroids and ACTH on the chromaffin cells of chick embryo's adrenal glands in organ culture*, « Acta Embr. Exp. », n. 2, in corso di stampa.
- MANELLI H. e MARGARITORA F. (1961) - *Tavole cronologiche dello sviluppo di Rana esculenta*, « Rend. Acc. Naz. dei XL », IV, 12, 1-13.
- MANELLI H. e MASTROLIA L. (1970) - *Sul differenziamento delle cellule adrenali nelle surrenali di embrioni di pollo ipofisectomizzati*, « Boll. di Zool. », 37, Abs. 441-446.
- POHORECKI L. A. e WURTMAN R. J. (1968) - *Induction of epinephrine forming enzyme by glucocorticoids: steroid hydroxylations and inductive effect*, « Nature », 219, 392-394.
- ROSSI A. (1958) - *Tavole cronologiche dello sviluppo embrionale e larvale del Bufo bufo (L.)*, « Mon. Zool. Ital. », 56, 1-16.
- SMITEN N. (1963) - *Cytological analysis of catecholamine synthesis in the ontogenesis of Vertebrates and problems of melanogenesis*, « Gen. Comp. Endocr. », 3, 362-377.
- WASSERMAN G. e BERNARD E. (1971) - *Influence of Corticoids on the PNMT activity in the adrenal glands of Gallus domesticus*, « Gen. Comp. Endocr. », 17, 83-93.
- WITSCHI E. e DALE E. (1962) - *Steroid Hormones at early developmental stages of Vertebrates*, « Gen. Comp. Endocr. », suppl. I, 356-361.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

1. - Sezione trasversale dell'apparato urogenitale di un girino di *Rana esculenta* (stadio 32, sec. Manelli e Margaritora, 1961): si osservano rare cellule con reazione cromaffine debolmente positiva (bicromato e cromato di potassio).
2. - Sezione trasversale della surrenale di un girino di *Rana esculenta* allo stadio 38. A questo stadio compaiono le prime cellule ad affinità con lo iodato, interpretabili quindi come cellule a noradrenalina (iodato di potassio).
3. - Sezione trasversale della surrenale di *Rana esculenta* al termine della metamorfosi (stadio 50): si osservano numerose cellule cromaffini ben differenziate (bicromato e cromato di potassio).
4. - Nella surrenale di un girino di *Bufo bufo* (stadio VIII, sec. Rossi, 1958) si osservano rare cellule con debole reazione cromaffine (bicromato e cromato di potassio).
5. - Sezione trasversale della surrenale di *Bufo bufo* al termine della metamorfosi (stadio XV): le cellule cromaffini, numerose e ben differenziate, sono evidenti tra i cordoni delle cellule corticali (bicromato e cromato di potassio).
6. - Al termine della metamorfosi (stadio XV) nella surrenale di *Bufo bufo* si mettono per la prima volta in evidenza cellule affini allo iodato di potassio, e quindi interpretabili come cellule a noradrenalina (iodato di potassio).

