
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

HARRY MANELLI, LUCIA MASTROLIA

**Azione dell'ACTH e reazione della steroide 3
 β -olodeidrogenasi nelle surrenali embrionali di pollo
coltivate in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 35 (1963), n.6, p. 598–601.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_35_6_598_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/>

Morfologia sperimentale. — *Azione dell'ACTH e reazione della steroide 3 β -olodeidrogenasi nelle surrenali embrionali di pollo coltivate in vitro* (*). Nota di HARRY MANELLI e LUCIA MASTROLIA, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

In un nostro recente lavoro (Manelli e Mastrolia [1]), è stato studiato il comportamento istologico *in vitro* delle surrenali embrionali di pollo. A proseguimento di queste ricerche, descriveremo in questa Nota i risultati ottenuti sottoponendo, ancora *in vitro*, le stesse ghiandole surrenali all'azione di differenti dosi di ACTH. Sono state prese in esame sia la struttura istologica che una particolare reazione istochimica, quella della 3 β -olodeidrogenasi. Questo enzima, che è specifico della trasformazione del pregnenolone a progesterone, è presente in tutte le ghiandole a secrezione steroide, essendo una delle prime tappe della biosintesi degli ormoni steroidi (Wettstein [2]). La 3 β -olodeidrogenasi, *in vivo*, è stata messa in evidenza nelle surrenali, sia normali che trattate con vari ormoni (ACTH, cortisolo, aldosterone, etc.) di alcuni vertebrati, e cioè da Chieffi e Botte in *Anguilla anguilla* [3] e nei girini e negli adulti di *Rana esculenta* [4]; da Cavallero e Chiappino in *Macacus rhesus* [5]; da Chieffi, Manelli, Botte e Mastrolia in embrioni di pollo [6]. Non esistono invece, per quanto ci consta, lavori riguardanti l'attività della 3 β -olodeidrogenasi *in vitro*. Nei Mammiferi le surrenali sono state studiate *in vitro* da Schaberg [7, 8]. Egli ha osservato nelle ghiandole di ratto sottoposte all'ACTH, la trasformazione delle cellule della zona glomerulare in cellule più o meno funzionanti della zona fascicolata; inoltre ha potuto dimostrare, con metodi biochimici, che le surrenali embrionali di ratto producono ormoni anche in coltura e che la quantità di questi aumenta sotto lo stimolo dell'ACTH, presente nelle colture, o dell'ipofisi.

Per la coltura delle surrenali, abbiamo seguito la tecnica di Et. Wolff e K. Haffen [9], usando il mezzo standard modificato con l'aggiunta di plasma di pollo (Manelli e Mastrolia [1]). Al mezzo di coltura venivano aggiunte le quantità stabilite di ACTH, previamente sciolte in liquido di Tyrode. Le surrenali embrionali di varia età, da nove a quattordici giorni, sono state trattate con variabili quantità di ACTH, da 0,5 a 4 mg, e i pezzi coltivati da un minimo di 2 a un massimo di 10 giorni. Essi venivano poi fissati parte in liquido di Bouin e colorati con ematossilina-eosina, e parte in liquido di Zenker e colorati con Giemsa.

(*) Ricerche eseguite presso l'Istituto di Zoologia della Università di Roma con il contributo del C.N.R. nell'ambito del Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta del 14 dicembre 1963.

Per porre in evidenza l'attività steroidogenica abbiamo applicato il metodo di Levy e coll. [10] per la 3β -olodeidrogenasi. Questo enzima era stato dimostrato biochimicamente da Samuels e coll. [11], mentre era stato messo in evidenza istochimicamente da Watterberg [12].

Le surrenali prelevate da embrioni di 12 giorni furono coltivate per 6,8 o 10 giorni, sul substrato contenente 2 mg di ACTH, e sul mezzo privo dell'ormone. I pezzi, sia trattati che controllo furono tagliati al criostato (12-15 micron), e incubati per circa 3 ore nella soluzione contenente il substrato, nel nostro caso deidroepiandrosterone, più DPN, più Nitro-BT ed un tampone fosfato a pH 7,1-7,4. Contemporaneamente per controllo, altre sezioni venivano incubate in un mezzo privo di substrato, ed un altro ancora in un mezzo contenente lattato di Na, per rivelare la presenza della deidrogenasi lattica. Per ogni pezzo, inoltre, alcune sezioni venivano colorate con Sudan nero per mettere in evidenza i lipidi *in toto*.

All'osservazione istologica è stato visto che, quando la dose di ACTH non supera i due mg, la struttura generale della surrenale e la forma delle sue cellule sono sostanzialmente le stesse sia nei controlli che nei trattati. Si rinvengono infatti i caratteristici gruppi o cordoni cellulari, composti di cellule propriamente interrenali e di qualche cellula adrenale o cromaffine, circondati da una leggera trama di connettivo. Soltanto il volume cellulare può essere maggiore nei trattati che nei controlli; le cellule appaiono allora turgide quasi rigonfie con un citoplasma più abbondante e più acidofilo. In rarissimi casi il citoplasma può presentare delle piccole aree otticamente vuote e non colorate.

A dosi più forti, da 4 mg in poi, la struttura ghiandolare subisce alterazioni profonde: i caratteristici cordoni non sono più visibili, le cellule sono sparse o raccolte in gruppi senza alcun ordine, i limiti cellulari non ben distinguibili. Anche la necrosi è più abbondante e il connettivo discontinuo e frammentato. Non di rado però si rinvengono mitosi più numerose nei trattati che nei controlli.

Osservazioni istochimiche. — La reazione della 3β -olodeidrogenasi si presenta sotto forma di precipitati di formazani blu-viola più o meno intensi a seconda dell'entità della reazione. Nei pezzi coltivati per 6 giorni, sia in quelli sottoposti al trattamento con ACTH che nei controlli la reazione dell'enzima è quasi uguale e per intensità e per estensione, e si presenta localizzata in numerose e piccole aree contigue; soltanto in qualche trattato si è notato che la reazione, pur non aumentando di intensità, appare più diffusa o meno circoscritta che nei controlli. Dal 7° giorno di coltura in poi, la reazione va gradualmente diminuendo nei controlli, mentre si mantiene pressoché invariata nei trattati, cosicché al 10° giorno di coltura, non troviamo più corrispondenza fra trattati e controlli; infatti, mentre nei primi la reazione della 3β -olodeidrogenasi è nettamente positiva, e si ritrova sparsa per tutto il pezzo in numerose piccole aree, nei controlli essa è quasi assente o localizzata in piccole zone alla periferia del pezzo.

La reazione del Sudan nero segue pressappoco l'andamento della 3β -olodeidrogenasi. Essa si presenta diffusa, in genere, nelle stesse aree in cui è presente la reazione della 3β -olodeidrogenasi. Nei pezzi di controllo coltivati per 10 giorni questa reazione si manifesta invece sotto forma di precipitati piccoli e poco numerosi.

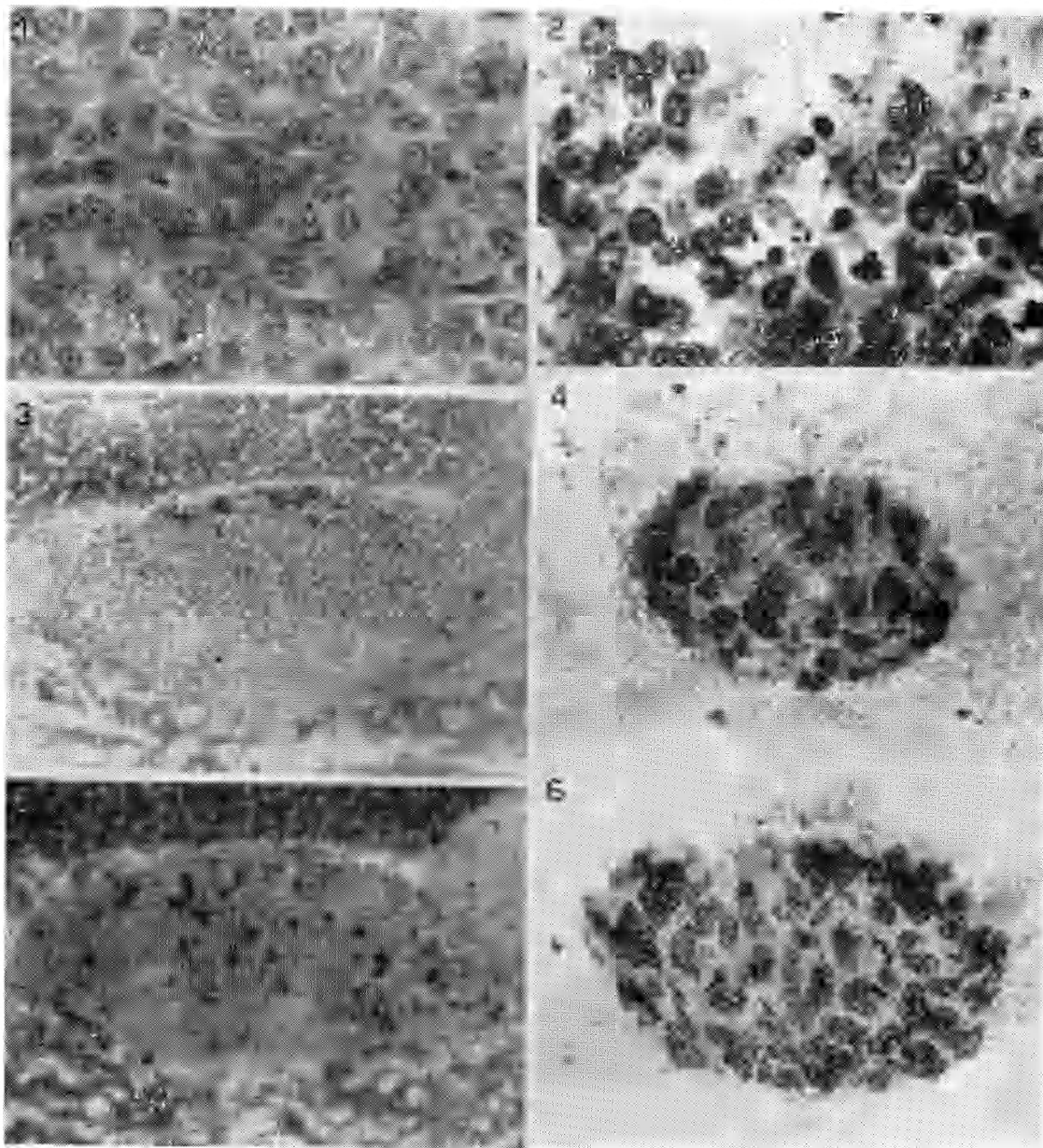
La reazione della deidrogenasi lattica è sempre evidente ed appare sotto forma di un precipitato blu scuro, distribuito uniformemente per tutta la grandezza del pezzo.

Osservando i risultati suesposti vi è anzitutto da mettere in evidenza che l'effetto dell'ACTH non si rivela - al livello istologico e con le tecniche di colorazione comune -, fino alla concentrazione di 2 mg, dopo di che questo effetto si manifesta soprattutto con alterazioni ed anomalie morfologiche e anche con necrosi e degenerazione dei tessuti. Al livello istochimico invece, si nota, anche con dosi basse di ACTH, un aumento della quantità dei lipidi, rivelati dal Sudan nero e parallelamente un mantenimento più prolungato dell'attività secretrice e un aumento della quantità della 3β -olodeidrogenasi. Siffatti risultati dimostrano dunque come frammenti di surrenali embrionali di pollo mantengano *in vitro* attività secretrice per un certo periodo di tempo, nel caso nostro fino a 6-8 giorni, dopo di che essi la perdono; inoltre gli stessi risultati dimostrano come questa attività lipidica e in particolare quella steroidogenica, si prolunghi ed aumenti sotto l'azione dell'ormone corticotropo. Vengono così indirettamente confermate le esperienze di Schaberg [7, 8], almeno per quel che riguarda la produzione di ormoni e di lipidi da parte delle surrenali embrionali di ratto, trattate *in vitro* con ACTH.

Le presenti ricerche confermano anche la validità dei risultati di esperimenti precedenti, ottenuti associando *in vitro* surrenali embrionali con gonadi o canali di Müller indifferenziati di embrioni di pollo (Manelli [13, 14]), nel senso che *in vitro* le surrenali stimulate o no con ACTH, mantenendo intatto per un certo tempo la capacità secretrice, dovrebbero influire sui predetti *tests* qualora contenessero ormoni in qualche modo sessualizzanti; perciò la mancata reazione dei *tests* maschili e la dubbia reazione di quelli femminili dipende rispettivamente dall'assenza o dall'esigua quantità di questi ormoni e non dalla inadeguatezza delle tecniche impiegate.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] H. MANELLI e L. MASTROLIA, *Culture in vitro di surrenali embrionali di pollo*, « Boll. Zool. », vol. XXIX, p. 679 (1962).
- [2] A. WETTSTEIN, *Biosynthèse des hormones stéroïdes*, « Experientia », vol. XVII, p. 329 (1961).
- [3] G. CHIEFFI e V. BOTTE, *Comportamento istochimico della steroide 3β -olodeidrogenasi nell'interrenale e nei corpuscoli di Stannius di Anguilla Anguilla L.*, « Atti Acc. Naz. Lincei », vol. XXXIV, fasc. 5^a, p. 570 (1963).
- [4] G. CHIEFFI e V. BOTTE, *Osservazioni istochimiche sull'attività della steroide 3β -olodeidrogenasi nella interrenale e nelle gonadi di girini ed adulti di Rana Esculenta*, « Atti Soc. Istochimica », IV Congr. Naz., Genova 14-15 dicembre (1962).



- [5] C. CAVALLERO e G. CHIAPPINO, *Histochemistry of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Monkey Adrenal Cortex*, « *Experientia* », vol. XIX, p. 569 (1963).
- [6] G. CHIEFFI, H. MANELLI, V. BOTTE e L. MASTROLIA, *Il differenziamento istochimico della interrenale e dei tessuti somatici della gonade embrionale di pollo: comportamento della steroide 3 β -olo-deidrogenasi*, « *Acta Embr. et Morph. Exp.* », XII Riunione del GEI, Padova 4-5 novembre 1963.
- [7] A. SCHABERG, *The influence of ACTH and anterior lobe of hypophysis on the adrenal cortex in vitro*, « *Proc. Koninkl. Ned. Akad. v. Wetenschappen* », vol. 60, p. 464 (1957).
- [8] A. SCHABERG, *Adrenal Cortex and anterior Pituitary*, « *La culture organotypique* », Colloques Internationaux du CNRS, Nogent-sur-Marne 29 août - 3 sept. 1960.
- [9] Et. WOLFF et K. HAFFEN, *Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro*, « *Texas Rep. Biol. Med.* », vol. 10, fasc. 2, p. 463 (1952).
- [10] H. LEVY, H. WEDLER DEANE, B. L. RUBIN, *Visualization of steroid 3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized Rats*, « *Endocrinology* » vol. 65, p. 932 (1959).
- [11] L. T. SAMUELS, M. L. HELMREICH, M. B. LASATER and H. REICH, *An Enzyme in Endocrine Tissues which Oxidizes Δ^5 -3 Hydroxy Steroids to α , β Unsaturated Ketones*, « *Science* », vol. 113, p. 490 (1951).
- [12] L. W. WATTEMBERG, *Microscopic histochemical demonstration of steroid 3 β -ol-dehydrogenase in tissue section*, « *J. Histochem. Cytochem.* », vol. 6, p. 225 (1958).
- [13] H. MANELLI, *Cultures et greffes de surrénales de Poulet et de Souris. Leur action sur la gonade et les canaux de Müller indifférenciés de oiseaux*, « *Bull. Biol. France et Belgique* », vol. XCV, fasc. 4, p. 557 (1961).
- [14] H. MANELLI, *Sul ruolo delle surrenali nella morfogenesi delle gonadi nell'embrione di Pollo*, « *Arch. Sci. Biol.* », vol. 47, p. 202 (1963).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Foto 1. - Sezione di surrenale controllo di un embrione di 12 giorni, coltivata *in vitro* per 3 giorni; la struttura istologica del tessuto ghiandolare è pressoché normale. (Ematossilina-eosina; 1400 $\times$).
- Foto 2. - Sezione di surrenale di un embrione di 10 giorni, coltivata *in vitro* per 3 giorni e trattata con 4 mg di ACTH; la struttura ghiandolare è profondamente alterata, con aree necrotizzate nella parte alta della fotografia. (Ematossilina-eosina; 1800 $\times$).
- Foto 3. - Sezione di surrenale controllo di embrione di 12 giorni, coltivata *in vitro* per 10 giorni. Reazione per la 3 β -olodeidrogenasi; colorazione di contrasto con carmallume. La reazione è positiva soltanto in piccole aree localizzate alla periferia del pezzo. (140 $\times$).
- Foto 4. - Sezione di surrenale di embrione di 12 giorni coltivata *in vitro* per 10 giorni in presenza di 2 mg di ACTH. Reazione per la 3 β -olodeidrogenasi; colorazione di contrasto con carmallume. La reazione è intensa e sparsa per tutta la estensione del pezzo. (200 $\times$).
- Foto 5. - Sezione di surrenale controllo di embrione di 12 giorni, coltivata *in vitro* per 10 giorni. Sudan nero. Le zone di reazione sono piccole e poco numerose. (140 $\times$).
- Foto 6. - Sezione di surrenale di embrione di 12 giorni, coltivata *in vitro* per 10 giorni in presenza di 2 mg di ACTH. Sudan nero. La reazione è intensa e diffusa per tutta l'estensione del pezzo. (140 $\times$).