
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO DE VINCENTIIS, FRANCESCO MARMO

Morfogenesi degli otoliti nell’embrione di pollo in presenza di diclorofenamide

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 601–604.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_601_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/>

Embriologia sperimentale. — *Morfogenesi degli otoliti nell'embrione di pollo in presenza di diclorofenamide* (*). Nota di MARIO DE VINCENTIIS e FRANCESCO MARMO, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

È noto che gli otoliti della maggior parte dei vertebrati sono formati da carbonato di calcio che, negli Uccelli, si trova sotto forma di calcite (Carlström ed Engström [1]) e da una matrice organica mucopolisaccaridica (Lyon [2]; Bélanger [3]; de Vincentiis, Marmo e Materazzi [4]; de Vincentiis e Marmo [5]). Recenti ricerche autoradiografiche (de Vincentiis e Marmo [6]) hanno mostrato in embrioni di pollo di 5 giorni di sviluppo una notevole incorporazione di ^{45}Ca a livello delle zone ove si formano gli otoliti, mentre una scarsa incorporazione si osserva a carico degli otoliti già perfettamente differenziati in embrioni di 12 giorni di incubazione. Evidentemente ciò è strettamente connesso alla morfogenesi otolitica che nell'embrione di pollo è attiva intorno al 5^o, 6^o e 7^o giorno di incubazione. Probabilmente nei meccanismi di deposizione del carbonato di calcio, nel momento nel quale si attua la morfogenesi otolitica, l'anidrasi carbonica potrebbe avere un ruolo di una certa importanza sia che la deposizione del carbonato avvenga secondo la reazione $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ sia che avvenga secondo quella $\text{OH}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^-$.

Nella presente Nota vengono riferite alcune osservazioni circa l'effetto esercitato dalla diclorofenamide (1-3 disulfamil-4-5-diclorobenzene) sulla morfogenesi del labirinto membranoso dell'embrione di pollo. La diclorofenamide, come è noto, è un derivato sulfamidico a spiccata azione inibitoria dell'anidrasi carbonica (Beyer [7]).

PARTE SPERIMENTALE.

In embrioni di pollo di 4 giorni di incubazione (stadio 23 secondo Lillie [8]) venivano inoculati nel bianco dell'uovo da 0,625 a 2,500 mg di diclorofenamide (1). La sostanza liofilizzata era disciolta in soluzione fisiologica e tale soluzione era inoculata nella quantità di 0,10 ml secondo le indicazioni di Conti e Milio [9]. Contemporaneamente venivano inoculate in altre uova, come controllo, lo stesso volume di soluzione fisiologica. Le uova venivano quindi deposte nella incubatrice e prelevate rispettivamente all'8^o,

(*) Istituto di Biologia Generale e Genetica Università di Napoli e Cattedra di Istologia ed Embriologia Università di Camerino. — Gruppo di ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'11 dicembre 1965.

(1) Desideriamo ringraziare vivamente la Ditta Italseber (Milano) che gentilmente ha fornito la diclorofenamide.

al 13° ed al 18° giorno di incubazione. Le teste venivano fissate in formalina neutra e quindi incluse in paraffina. Le sezioni microtomiche erano trattate per la reazione PAS o colorate con alcian-PAS (Mowry [10]).

RISULTATI.

Negli esperimenti effettuati si notano alterazioni unicamente a carico degli otoliti; infatti, nella maggior parte dei casi, la loro morfogenesi è bilateralmente inibita. Al contrario l'epitelio maculare è normale ed anche morfologicamente normale è il differenziamento delle altre strutture del labirinto membranoso (creste, cupole, organo del Corti). In pochi casi l'assenza degli otoliti si riscontra solo da un lato, mentre in altri la loro morfogenesi è limitata alla presenza di pochi granuli calcificati che tendono a confluire tra di loro in modo, da formare, talora, un unico grosso otolite generalmente localizzato in un sacco di un solo lato. Sull'epitelio maculare, a livello delle zone ove è presente lo strato gelatinoso, si rinviene la presenza di materiale PAS positivo.

Nella Tabella vengono riassunte le alterazioni osservate a carico della morfogenesi degli otoliti.

TABELLA.

	No di embr.	Giorni di sviluppo al quale gli embrioni venivano sacrificati	Embrioni sopravvissuti al trattamento	Presenza degli otoliti in ambedue i labirinti	Presenza degli otoliti solo in un labirinto	Assenza degli otoliti in ambedue i labirinti
<i>Embrioni controllo</i> (Trattati con soluzione fisiologica)	12	(8°)	9	9	—	—
idem	7	(13°)	4	4	—	—
idem	7	(18°)	4	4	—	—
<i>Embrioni trattati con diclorofenamide</i>						
0,625 mg per uovo	8	(8°)	4	—	2	2
1,250 » » »	18	(8°)	8	—	1	7
1,875 » » »	5	(8°)	2	—	—	2
2,500 » » »	6	(8°)	2	—	2	—
1,250 » » »	7	(13°)	3	—	—	3
1,875 » » »	5	(13°)	2	—	—	2
1,875 » » »	6	(18°)	2	—	—	2

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.

I risultati ottenuti mettono in evidenza che la diclorofenamida esplica, nella morfogenesi del labirinto membranoso dell'embrione di pollo, un'azione elettiva nella formazione degli otoliti. Tale azione è da mettersi, molto probabilmente, in rapporto agli effetti inibitori esplicati dalla suddetta sostanza sull'anidrasa carbonica, effetti, per altro, comuni ad un altro inibitore dell'enzima quale la acetazolamide sodica (Marmo [11]). L'intervento di tale enzima, pertanto, nella morfogenesi otolitica si esplicherebbe proprio nel momento in cui si viene ad avere un elevato ricambio di ^{45}Ca a livello delle diverse zone del labirinto membranoso dalle quali si originano gli otoliti. Tale maggiore ricambio del ^{45}Ca (espressione di deposizione di calcio sotto forma di carbonato [1]) avviene negli embrioni di pollo intorno al 5^o, 6^o e 7^o giorno di incubazione [6].

È noto d'altronde che negli Echinodermi (Stolkowskj [12]) e nei Molluschi (Stolkowskj [12]; Wilbur e Jodrey [13]; Abolinš-Krogis [14]) l'anidrasa carbonica ha una parte molto importante nella deposizione del carbonato di calcio. In *Cassostrea virginica*, Wilbur e Jodrey [13] hanno dimostrato che, nel processo di calcificazione, l'intervento dell'anidrasa carbonica è particolarmente richiesto allorché il grado di deposizione del carbonato è elevato; quando, invece, il grado di deposizione del calcio è basso l'intervento dell'enzima non sarebbe richiesto poiché l'idratazione del CO_2 è sufficientemente rapida anche in assenza dell'enzima.

Tale dato è di particolare interesse se messo in connessione con quanto da noi [6] osservato nell'embrione di pollo circa l'elevata deposizione di ^{45}Ca sulla matrice organica al 5^o, 6^o e 7^o giorno di incubazione e le concomitanti alterazioni che vengono ad aversi nella morfogenesi otolitica dopo iniezione, al 4^o giorno di incubazione, di diclorofenamida. Inoltre l'osservazione che le alterazioni nella morfogenesi otolitica persistono ancora al 18^o giorno di incubazione lascia presumere che l'intervento dell'anidrasa carbonica sia particolarmente richiesto proprio nel momento nel quale è elevato il grado di deposizione del calcio sulla matrice organica otolitica (5^o, 6^o e 7^o giorno di incubazione) e, sotto questo profilo, l'enzima acquisterebbe un ruolo di primaria importanza nella morfogenesi degli otoliti del pollo.

Da segnalare che ricerche biochimiche (Erulkar e Maren [15]) hanno dimostrato in gatti adulti che il labirinto membranoso è uno degli organi a più alto contenuto di anidrasa carbonica (la maggiore concentrazione è stata riscontrata a livello della chiocciola e del sacco endolinfatico) e che nella cavia e nel ratto adulto l'enzima è stato localizzato, istochimicamente, a livello della *stria vascularis* (Watanabe [16]).

BIBLIOGRAFIA.

- [1] D. CARLSTRÖM e H. ENGSTRÖM, « Acta oto-Laryngol », 45, 14 (1955).
 [2] M. F. LYON, « J. Embryol. exp. Morph. », 3, 213 (1955).
 [3] L. F. BÉLANGER, « Science », 118, 520 (1953).
 [4] M. DE VINCENTIIS, F. MARMO, G. MATERAZZI, « Riv. d'Istoch. », 10, 733 (1964).
 [5] M. DE VINCENTIIS, F. MARMO, « Experientia », 21, 258 (1965).
 [6] M. DE VINCENTIIS, F. MARMO, « J. Embryol. Exp. Morph. », in corso di stampa (1966).
 [7] K. H. BEYER, « A.M.A. Arch. Int. Med. », 102, 1016 (1958).
 [8] F. R. LILLIE, *Development of the chick*, Ed. H. Holt and Company, New York (1952).
 [9] G. CONTI e G. MILIO, « Experientia », 20, 110 (1964); Ibidem, 20, 331 (1964).
 [10] R. W. MOWRY, « J. Hist. Cyt. », 4, 407 (1956).
 [11] F. MARMO, « Boll. Zool. », in corso di stampa (1965).
 [12] J. STOLKOWSKJ, « Ann. Inst. Oceanogr. Monaco », 26, 1 (1951).
 [13] K. M. WILBUR, L. H. JODREY, « Biol. Bull. », 108, 359 (1955).
 [14] A. ABOLINŠ-KROGIS, « Acta Zool. », 39, 1 (1958).
 [15] D. S. ERULKAR e T. H. MAREN, « Nature », 189, 459 (1961).
 [16] Y. WATANABE, « Jap. J. Otol. Tokyo », 66, 657 (1963).

SUMMARY. — The morphogenesis of the membranous labyrinth of chick embryos has been investigated in the presence of dichlorophenamide (1-3 disulfamil-4-5 dichlorobenzene). The substance has been injected into the egg white on chick embryos of 4 days of incubation. The results show a inhibitory specific effect on the otolith morphogenesis. The Authors think that these effects may be related to the carbonic anhydrase inhibition activity of the drug employed.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. — Embrione di 13 giorni di sviluppo (controllo). Labirinto membranoso. ($\times 141$).
 Si osserva la presenza della membrana otolitica a livello delle regioni maculari dell'utricolo e del sacco.
- Fig. 2. — Embrione di 13 giorni di sviluppo (trattato con 1,875 mg di diclorofenamide/uovo). Labirinto membranoso. ($\times 141$).
 Assenza degli otoliti a livello delle regioni maculari dell'utricolo e del sacco.
- Fig. 3. — Embrione di 13 giorni di sviluppo (particolare della fig. 2). ($\times 634$).
 Assenza degli otoliti a livello della macula dell'utricolo, al di sopra della quale si nota la presenza di un materiale Alcian-PAS positivo.

