
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIO DE VINCENTIIS, FRANCESCO MARMO

Osservazioni sul differenziamento in vitro della cartilagine otica in embrioni di pollo in presenza di acti-nomicina D

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.1, p. 122–125.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_1_122_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. — *Osservazioni sul differenziamento in vitro della cartilagine otica in embrioni di pollo in presenza di actinomicina D.* (*). Nota di MARIO DE VINCENTIIS e FRANCESCO MARMO presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The differentiation "in vitro" of otic cartilage of chick embryos has been investigated in the presence of actinomycin D. The otocysts have been explanted from embryos of five days of incubation. The results do not show any differentiation of the otic mesenchyme in the cartilage. The obtained results are discussed by the Authors.

Il problema della genesi della capsula otica nell'embrione di pollo è stato studiato da Benoit [1]. I risultati ai quali giunge questo autore possono così riassumersi: *a)* l'epitelio uditivo non è l'induttore specifico, in senso stretto, della cartilagine otica osservandosi differenziamento anche in presenza di corda e di midollo; *b)* fra i diversi territori mesenchimatosi solo quello otico si è rivelato competente nei riguardi dell'induttore; *c)* l'induzione della cartilagine otica avviene attraverso una sostanza diffusibile.

Di particolare interesse sono gli esperimenti effettuati sul mesenchima otico coltivato *in vitro*: quando il mesenchima è prelevato da embrioni di cinque giorni esso è capace di differenziarsi in tessuto precartilagineo, quando, invece, è prelevato da embrioni di quattro giorni esso si coltiva male e si disperde rapidamente sul mezzo (Benoit [2]). In presenza di un estratto di otocisti di 5 giorni, il mesenchima otico, prelevato da embrioni di cinque giorni, si differenzia in gran parte in cartilagine. Questi esperimenti stanno a dimostrare che, in tali condizioni, l'induzione della cartilagine si effettua mediante una sostanza diffusibile presente nell'otocisti.

Precedenti ricerche (de Vincentiis e Marmo [3]) hanno messo in evidenza in embrioni di pollo una caratteristica segregazione di RNA alla base dell'epitelio dell'otocisti nel periodo nel quale esso eserciterebbe la sua azione induttrice sul mesenchima competente. Tale osservazione è di un certo interesse se messa in connessione agli esperimenti suddescritti.

Nella presente Nota vengono riferiti i primi risultati di esperimenti condotti coltivando *in vitro* abbozzi di otocisti di embrioni di pollo, in presenza di actinomicina D.

PARTE SPERIMENTALE.

Le otocisti venivano prelevate da embrioni di pollo di cinque giorni di sviluppo (stadio 26 sec. Lillie [4]). Il metodo di cultura era quello indicato da Wolff e Haffen [5]; si è usata la membrana vitellina secondo le indicazioni

(*) 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.

di Wolff [6] con la variante però che l'abbozzo non era avvolto dalla stessa. La concentrazione di actinomicina D ⁽¹⁾ nel mezzo variava da 0,013 a 0,0064 µg/ml. La durata della cultura era di 12 giorni. Gli espianti venivano quindi fissati in Carnoy o in Helly, inclusi in paraffina e le sezioni microtomiche colorate o con blu di toluidina al 2% o con l'alcian-PAS (Mowry [7]).

RISULTATI.

I risultati delle varie esperienze possono così riassumersi:

a) negli espianti controllo, coltivati in mezzo standard (n° 20), si è osservato costantemente il differenziamento del mesenchima otico nel caratteristico tessuto cartilagineo (fig. 1). A carico dell'epitelio otocistico si è notata la formazione di creste ampollari con cupole nonché anche un buon differenziamento delle maculae e dell'organo di Corti;

b) negli espianti coltivati in presenza di actinomicina D (n° 20), non si è mai osservato un differenziamento del mesenchima otico nel caratteristico tessuto cartilagineo. In alcuni casi il differenziamento si è arrestato quasi del tutto, in altri è andato avanti sino a costituire un tessuto pre-cartilagineo (figg. 2, 3). Benoit [1], distingue un tessuto precartilagineo meno evoluto ove le cellule fusiformi o stellate, divise tra di loro, sono riunite da fini anastomosi (precartilagine 1); ed un tessuto precartilagineo costituito da elementi molto vicini gli uni agli altri che presentano nuclei tondeggianti (precartilagine 2). In tutti i casi esaminati l'epitelio otocistico si presentava in buone condizioni; il differenziamento, però, delle creste, delle cupole e delle maculae era molto meno evidente rispetto ai controlli. Nel lume vi era presenza di materiale metacromatico, alcian-PAS positivo. La basofilia dell'epitelio era debolissima.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

In presenza di actinomicina D non avviene il differenziamento in cartilagine del mesenchima otico espiantando quest'ultimo insieme all'abbozzo otocistico prelevato al 5° giorno di incubazione e coltivato *in vitro* per un periodo di 12 giorni; anche il differenziamento dell'epitelio otocistico è influenzato notandosi una certa sua inibizione.

L'actinomicina può avere esplicata la sua azione citostatica o mediante un effetto tossico aspecifico o mediante il blocco della sintesi di RNA messaggero combinandosi essa con il DNA (Kirk [8]; Reich, Goldberg e Rabinowitz [9]; Shatkin [10]; Merits [11]; Paul e Struthers [12]; Perry [13]; Staehlin, Wettstein, Noll [14]) ed inibendo quindi la RNA-polimerasi.

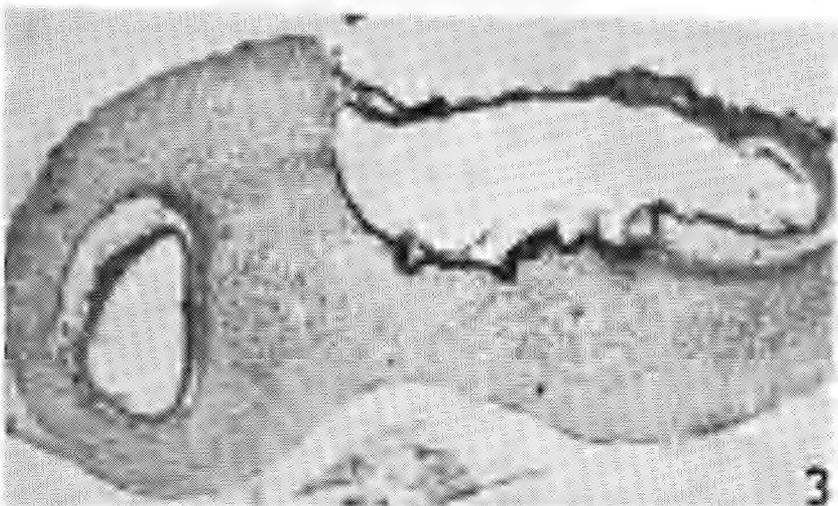
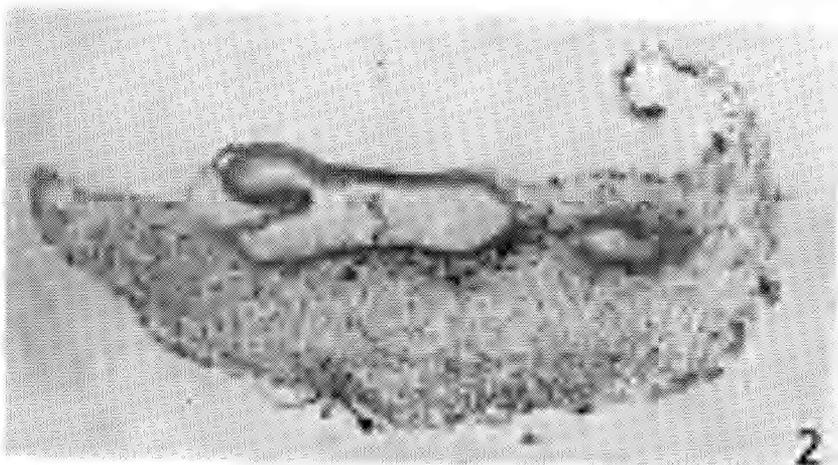
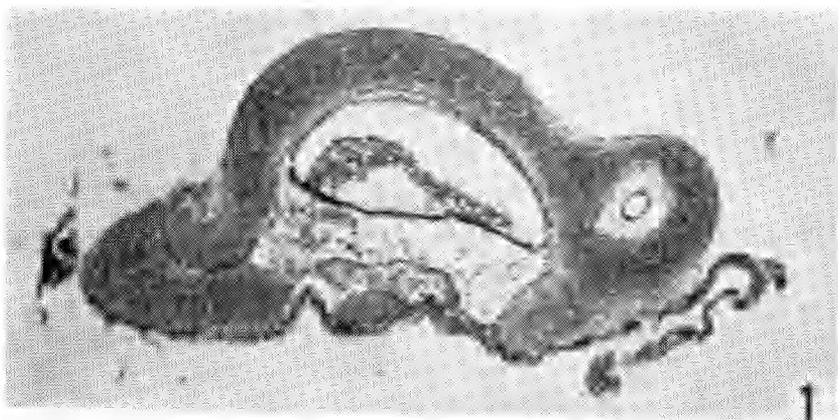
(1) L'actinomicina D era gentilmente fornita da Sharpe & Dohme Research Laboratories, Rahways, N.J., che vivamente ringraziamo.

I risultati dei nostri esperimenti porterebbero ad escludere un effetto tossico aspecifico esplicato dalla actinomicina D, poiché, in linea di massima, l'aspetto morfologico dei vari elementi non mostra gravi segni di sofferenza. Infatti, a parte la presenza di qualche nucleo, in picnosi, osservabile in alcuni espianti, i vari elementi cellulari appaiono in buone condizioni. Prenderebbe, pertanto, maggiore consistenza l'ipotesi che l'effetto citostatico osservato possa dipendere dalla inibizione specifica della sintesi di RNA (anche tenendo presente le debolissime dosi di actinomicina adoperate). Sotto questo aspetto, nel quadro dei contributi allo studio dei processi induttori che presiedono al differenziamento in cartilagine del mesenchima otico, bene si accorderebbero i risultati delle presenti osservazioni con quelli da noi [3] precedentemente ottenuti sulla caratteristica segregazione di RNA dell'abbozzo otocistico e con quelli surriferiti di Benoit [1, 2], sulle culture *in vitro* di mesenchima otico.

Infatti, negli esperimenti di Benoit [1] il mesenchima otico, prelevato da embrioni di cinque giorni e coltivato *in vitro*, è capace di differenziarsi in cartilagine solo in presenza di estratti di otocisti di cinque giorni, altrimenti il suo differenziamento si arresta a quello di tessuto precartilagineo. Ciò sta a dimostrare che per aversi il differenziamento in cartilagine del mesenchima otico è necessario l'intervento di un agente induttore diffusibile presente nell'otocisti. Ora le nostre precedenti osservazioni citochimiche [3] avevano dimostrato una caratteristica segregazione di RNA alla base dell'epitelio otocistico confinante con il mesenchima otico, in immediata precedenza o nel periodo durante il quale secondo Benoit [1] si realizza l'induzione della cartilagine otica. L'aver dimostrato, con le esperienze riferite nella presente Nota, che il differenziamento del mesenchima otico in cartilagine viene inibito da debolissime dosi di actinomicina D osservandosi o un arresto del differenziamento o, al massimo, il suo proseguimento sino a quello di tessuto precartilagineo (con quadri simili a quelli descritti da Benoit [1] coltivando *in vitro* solo mesenchima otico), tenendo presente quanto su riferito circa un intervento dell'actinomicina D nell'inibire la sintesi di RNA messaggero, prenderebbe una certa consistenza l'ipotesi che l'induzione della cartilagine otica nel pollo sia controllata dalla sintesi di RNA e che questo possa essere in qualche modo correlato con la sostanza diffusibile dotata di potere induttivo di Benoit [1].

Anche il disturbo di differenziamento osservato a carico del labirinto membranoso negli espianti coltivati in presenza di actinomicina D potrebbe essere messo in relazione ad una inibizione della sintesi di RNA e, sotto tale aspetto, interessante da sottolineare è la debolissima basofilia che presenta l'epitelio di tali espianti rispetto a quello dei controlli coltivati in mezzo standard.

Che nell'embrione di pollo gli effetti citostatici esplicati dall'actinomicina siano messi in connessione ad una inibizione della sintesi di RNA e di proteine è sostenuto, negli esperimenti *in vivo*, da Pierro [15] e da quelli *in vitro* di Klein e Pierro [16] e di Heilporn-Pohl [17].



BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. AA. BENOIT, «Ann. de Sci. Naz. Zool.», 12^a serie, 323 (1960).
- [2] J. A. A. BENOIT, «J. Embr. exp. Morph.», 8, 33 (1960).
- [3] M. DE VINCENTIIS, F. MARMO, «Naturwiss.», 52, 348 (1965).
- [4] F. R. LILLIE, *Development of the chick*, Ed. Hold and Company, New York 1952.
- [5] ET. WOLFF e K. HAFFEN, «Texas Rep. Biol. Med.», 10, 463 (1952).
- [6] ET. WOLFF, «C.R. Acad. d. Sci.», 250, 3881 (1960).
- [7] R. W. MOWRY, «J. Histochem. Cytochem.», 4, 407 (1956).
- [8] J. M. KIRK, «Biochem. Biophys. Acta», 42, 167 (1960).
- [9] R. REICH, I. H. GOLDBERG, M. RABINOWITZ, «Nature», 196, 743 (1962).
- [10] A. J. SHATKIN, «Biochim. Biophys. Acta», 61, 310 (1962).
- [11] I. MERITS, «Biochem. Biophys. Res. Commun», 10, 254 (1963).
- [12] J. PAUL e M.H. STRUTHERS, «Biochem. Biophys. Res. Commun», 11, 135 (1963).
- [13] R. P. PERRY, «Exp. Cell. Res.», 29, 400 (1963).
- [14] T. STAHLIN F. O. WETTSTEIN, H. NOLL, «Science», 140, 180 (1963).
- [15] L. J. PIERRO, «J. Exp. Zool.», 241 (1965).
- [16] N. W. KLEIN e L. J. PIERRO, «Science», 142, 967 (1963).
- [17] V. HEILPORN-POHL, «J. Embryol. Exp. Morphol.», 11, 439 (1964).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Abbozzo otocistico di embrione di pollo espiantato da embrione di 5 giorni di incubazione e coltivato *in vitro* in mezzo standard per 12 giorni. ($\times 65$).
Si nota il normale differenziamento della cartilagine otica.
- Fig. 2. - Abbozzo otocistico di embrione di pollo espiantato da embrione di 5 giorni di incubazione e coltivato *in vitro* in presenza di actinomicina D (0,0064 $\mu\text{g/ml}$). ($\times 141$).
Si nota che il mesenchima otico si è differenziato in tessuto precartilagineo (precartilagine 1, sec. Benoit [1]).
- Fig. 3. - Abbozzo di otocisti di embrione di pollo espiantato da embrione di 5 giorni di incubazione e coltivato *in vitro* in presenza di actinomicina D (0,0071 $\mu\text{g/ml}$). ($\times 141$).
Si nota che il mesenchima otico si è differenziato in un tessuto pre-cartilagineo meno evoluto di quello della fig. 2 (precartilagine 2, sec. Benoit [1]).