
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIUSEPPINA JACI, CATERINA MANSUETO-BONACCORSO

Azione di alcuni aminoacidi e dei loro analoghi sullo sviluppo dell'uovo degli Anfibi

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.5, p. 724-728.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_5_724_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. — *Azione di alcuni amino acidi e dei loro analoghi sullo sviluppo dell'uovo degli Anfibi* (*). Nota di GIUSEPPINA JACI e CATERINA MANSUETO-BONACCORSO (**), presentata (***) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — The action of some amino acids and their analogues on the embryonic development of *Discoglossus pictus* was studied. Abnormal development is obtained with 0,1 M cystein.

Gastrula and neurula are the stages more sensitive to the action of the amino acid. The embryos are hydropic, with distorted and reduced tails; they also present reduced eyes, abnormal vascular system and fused adhesive organs.

INTRODUZIONE.

1. L'esistenza di un pool di amino acidi liberi nell'uovo vergine pone, allo studioso dei problemi dello sviluppo, numerosi interrogativi: in primo luogo quello del suo significato.

La prima ipotesi che può farsi, al riguardo, è che tale « pool » sia un residuo che non fu impiegato per la costruzione delle proteine dei granuli vitellini; ma può, anche, supporre che sia un deposito per nulla accidentale, anzi quanto mai utile per le sintesi proteiche, che, come si sa, occorrono nei primi momenti dello sviluppo. Può anche supporre, infine, che esso serva a determinare condizioni ottimali (pH) per lo svolgersi dell'attività degli enzimi implicati in queste sintesi.

2. Un dato di notevole importanza per quanto concerne lo sviluppo embrionale è che qualitativamente e quantitativamente gli amino acidi del pool variano lungo tale sviluppo.

Il significato di questa variazione è molto oscuro, ma ciò è dovuto al fatto che le indagini finora eseguite sono state scarse, frammentarie e spesso contraddittorie.

Una variazione notevole è stata riscontrata alla fecondazione: Örström [1], nell'uovo di riccio di mare, ha constatato che nei primi 10' successivi alla fecondazione esso aumenta notevolmente; ciò indurrebbe a ritenere che la fecondazione è accompagnata da una attiva proteolisi. Sull'uovo di riccio di mare ricerche più estese sono quelle di Kawanau [2-4], che abbracciano tutto il periodo dello sviluppo embrionale. Anche secondo tale autore il metabolismo degli amino acidi cambia profondamente alla fecondazione; ulteriori

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Zoologia della Università di Palermo, sotto la direzione del prof. G. Reverberi.

(**) Ricercatrice presso il Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(***) Nella seduta del 13 maggio 1967.

cambiamenti (ciclici) sono stati riscontrati lungo lo sviluppo. D'altra parte le ricerche di Chen e Baltzer [5], su diverse specie di Echinodermi, non rilevano modificazioni qualitative degli amino acidi del pool. Ciò vale anche per le uova di Ascidie [6] e di alcuni Molluschi (*Aplysia*) [7]. Per quanto riguarda l'uovo di Pesci [8] e quello degli Urodeli [9, 10], il numero degli amino acidi presenti nel pool aumenta, invece, col procedere dello sviluppo. Questo fatto probabilmente è dovuto alla vitellolisi.

3. Le ricerche ora citate sono state portate sulle uova e sugli embrioni (di diversi stadi di sviluppo) *interi*: ed esse perciò non ci dicono nulla sul contenuto in amino acidi dei singoli territori embrionali al momento del loro differenziamento.

Se una determinazione simile fosse possibile il problema del differenziamento ne riceverebbe vantaggio. Le ricerche più fruttifere in questo senso sono quelle di Deuchar [11, 12]. Di notevole interesse è la segnalazione della leucina nel territorio d'origine della muscolatura [13-16].

4. Queste ultime ricerche sollevano molti problemi:

a) può modificarsi la morfogenesi alterando quantitativamente o, meglio, qualitativamente, la composizione del pool?

b) può, la morfogenesi di qualche organo specifico essere modificata dalla introduzione nel pool di qualche analogo?

Si può dare qualche risposta a queste interrogazioni. Hermann [16] e Rotfels [17], sull'embrione di pollo, hanno constatato che il trattamento con gli analoghi della leucina impediscono la metamerizzazione del territorio presuntivo dei somiti.

Wilde [18, 19] ha osservato che le cellule delle creste neurali degli Anfibi (il cui differenziamento è dipendente dalla fenilalanina) subiscono un differenziamento anomalo se vengono sottoposte all'azione di alcuni analoghi di essa (2-tienil-alanina, acido fenil-lattico, p-fluoro-fenilalanina).

Negli Echinodermi [20] è stato osservato che il trattamento delle uova con 8-cloroxantina e l'acido β -fenil-lattico produce radializzazione delle larve. Bosco e Monroy [21] hanno rimarcato che l'etionina inibisce la formazione del mesenchima primario.

5. Questi risultati sono comprensibili se si ha presente il meccanismo della sintesi proteica. Com'è noto, gli amino acidi per essere incorporati devono essere prima attivati (dall'ATP); poi devono venire legati all's-RNA loro proprio; quindi devono essere portati con questo sul ribosoma.

Questo meccanismo sembra essere rigorosamente condizionato: sì che l'addizione al pool di amino acidi liberi di quantità inusuali di un amino acido o di un altro, ovvero di loro analoghi, potrebbe determinare effetti imprevedibili.

6. L'azione esercitata dagli amino acidi addizionati all'ambiente in cui si compie lo sviluppo embrionale è stata studiata in modo frammentario e spesso con scopi diversi da quelli qui considerati.

Nelle Ascidie la modificazione qualitativa e quantitativa del pool, o l'uso di analoghi, ha dato risultati interessanti con la cisteina, la fluoro-fenilalanina, la nitro-fenilalanina e il fluoro-triptofano [22, 23]. Per quello che riguarda l'azione della cisteina, che costituisce l'oggetto della presente ricerca, essa è stata seguita sulle uova degli Echinodermi [24], e di pollo [25].

Facendo seguito alle ricerche eseguite sull'uovo di Ascidie la ricerca è stata estesa all'uovo di Anfibi e precisamente all'uovo di *Discoglossus pictus*. Queste ricerche intendono precisare e ampliare alcuni brevi dati riportati in precedenza da Brachet [26].

MATERIALE E METODO.

Come materiale di esperimento furono usate uova di *Discoglossus pictus* a vari stadi di sviluppo. Esse furono previamente private del coat gelatinoso quindi furono messe a sviluppare in soluzioni di: L(—)cisteina (sol. 0,1 M; 0,05 M; 0,02 M; pH = 7); L(—)cistina (sol. 0,1 M; pH = 7); L(—)istidina (sol. 0,1 M; pH = 7,9); L(—)metionina (sol. 0,1 M; pH = 6,9); L(—)triptofano (sol. 0,05 M; pH = 7); L(—)metilcisteina (sol. 0,1 M; pH = 6,7); 5-fluorotriptofano (sol. 0,01 M; pH = 7); p-fluorofenilalanina (sol. 0,01 M; pH = 7); p-nitro DL fenilalanina (sol. 0,01 M; pH = 6,5). Le soluzioni furono preparate in Holtfreter, tranne quelle della cisteina che furono preparate in Sterns [27]. Queste ultime venivano rinnovate ogni 2 ore a causa della facile ossidazione della cisteina.

RISULTATI.

1. *Trattamento con L-cisteina* (0,1 M).

a) *Uova appena fecondate*. Le uova furono lasciate in soluzione di cisteina per 12 ore; in tale tempo esse raggiunsero lo stadio di blastula. Lo sviluppo fu normale. Con le soluzioni 0,05 M e 0,02 M si ebbero identici risultati.

b) *Stadio di blastula*. Le uova furono tenute nella soluzione fino all'inizio della gastrulazione. Lo sviluppo fu del tutto regolare.

c) *Stadio di gastrula iniziale*. Gli embrioni furono lasciati nella soluzione fino a neurula iniziale.

Gli embrioni che si svilupparono furono molto anomali. Risultarono idropici, con coda storta, ridotta; presentarono pure occhi ridotti, organi adesivi fusi; bocca asimmetrica; circolazione anomala con grumi sanguigni (Tav. I, fig. 2).

Con soluzioni più lievi (sol. 0,05 M) le anomalie risultarono minori o non vi furono affatto (sol. 0,02 M).

d) *Stadio di neurula*. Gli embrioni rimasero nella soluzione 0,1 M per tutta la neurulazione. Gli embrioni si svilupparono molto anomali. Le anomalie riscontrate furono dello stesso tipo di quelle riferite precedentemente; forse a carico maggiormente del sistema nervoso.

e) *Bottone codale*. Lo sviluppo fu del tutto normale.

2. *Trattamento con cistina, istidina, metionina e triptofano.*

Le uova furono poste nelle soluzioni allo stadio di blastula iniziale e ivi lasciate fino a che fu raggiunto lo stadio di girino. In questi non fu riscontrata alcuna anomalia.

3. *Trattamento con analoghi di amino acidi (L-metilcisteina, 5-fluorotriptofano, p-fluoro-fenilalanina, p-nitro-fenilalanina).*

Lo sviluppo in tutti i casi si svolse in modo normale come nei controlli. Solo con il 5-fluoro-triptofano e la p-fluoro-fenilalanina si ebbe sviluppo leggermente ritardato.

DISCUSSIONE.

1° Dagli esperimenti riferiti risulta che la cisteina ha un'azione gravemente disturbatrice dello sviluppo normale. La sua azione si esercita solo ad elevate concentrazioni e solo sulle gastrule e sulle neurule.

Le anomalie consistono (oltre che in un ritardo nello sviluppo) in una forte idropisia che forse determina storture gravi della coda; microcefalia; riduzione degli occhi; fusione degli organi adesivi.

È da ricordare al proposito che il trattamento con la cisteina produce anomalie anche negli embrioni di riccio di mare [24], di pollo [25], di *Ciona intestinalis* [22].

2° Il problema che ha interessato tutti gli Autori ora citati è quello del meccanismo della sua azione. Diverse ipotesi sono state avanzate: particolarmente soddisfacente è quella che ammette che la cisteina agisce su alcuni enzimi [28, 29]: così sulla DNA-polimerasi [30]; probabilmente sugli enzimi respiratori: infatti l'attività respiratoria è colpita dal trattamento con la cisteina. Su cellule ascitiche [31] e su culture di tessuti su membrana corioallantoidea dell'embrione di pollo [32] si è riscontrato che la respirazione endogena è notevolmente abbassata.

L'azione è probabilmente imputabile ai gruppi-SH. Brachet [26], che in un lavoro riguardante l'azione del mercaptoetanolo sullo sviluppo degli Anfibi discute anche l'azione della cisteina (*Bufo*), rilevando i suoi effetti sulla formazione del sistema nervoso, attribuisce notevole importanza ai gruppi-SH. Una conferma di ciò sta nel fatto che là dove i gruppi-SH sono ossidati [S-S] come nella cistina, l'azione è del tutto nulla.

3° Lo studio in sezione delle larve anomale a seguito dell'azione della cisteina non è stato compiuto, ma il fatto, già notato da Brachet, che il sistema nervoso è particolarmente colpito dall'azione delle sostanze che posseggono gruppi-SH, è molto significativo. Lo stabilirsi della idropisia deve avere alla base anomalie nel sistema escretorio; ma è prematura ogni ipotesi, in assenza di uno studio istologico.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. ÖRSTRÖM, «Archiv Kemi», 15A, n. 1 (1941).
[2] J. L. KAVANAU, «J. Exp. Zool.», 122, 285 (1953).
[3] J. L. KAVANAU, «Exptl. Cell Res.», 7, 530 (1954).
[4] J. L. KAVANAU, *The chemical basis of development*, McElroy & Glass eds., p. 44, Baltimore 1958.
[5] P. S. CHEN e F. BALTZER, «Nature (London)», 181, 98 (1958).
[6] U. FERRINI, M. L. MERCANTE, A. CAPUTO, S. MINAFRA e G. REVERBERI, «Ric. Sci.», 34 (II-B), 213 (1964).
[7] G. REVERBERI, M. MOLINARO e S. METAFORA, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 7, 101 (1964).
[8] J. COLAS e M. C. DEVILLERS, «C. R. Acad. Sci.», 225, 1997 (1962).
[9] P. S. CHEN e J. RICHENBACHER, «Exper.», 10, 182 (1954).
[10] P. S. CHEN, «Exptl. Cell Res.», 10, 675 (1956).
[11] E. M. DEUCHAR, «J. Embryol. Exp. Morph.», 4, 327 (1956).
[12] E. M. DEUCHAR, «Symp. Soc. Exp. Biol.», 17, 58 (1963).
[13] E. M. DEUCHAR, «Devel. Biol.», 2, 129 (1960).
[14] E. M. DEUCHAR, «Exptl. Cell Res.», 25, 264 (1961).
[15] E. M. DEUCHAR, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 6, 7 (1963).
[16] H. HERRMANN, «J. Embryol. Exp. Morph.», 1, 291 (1953).
[17] U. ROTHFELS, «J. Exp. Zool.», 125, 17 (1954).
[18] C. E. WILDE, «J. Morphol.», 97, 313 (1955).
[19] C. E. WILDE, «J. Exp. Zool.», 133, 409 (1956).
[20] S. HÖRSTADIUS e T. GUSTAFSON, «J. Embryol. Exp. Morph.», 2, 216 (1954).
[21] M. BOSCO e A. MONROY, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 3, 53 (1960).
[22] G. REVERBERI, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 8, 132 (1965).
[23] A. M. FIASCONARO, «Ric. Sci.» (II-B), 6, 387 (1965).
[24] R. LALLIER, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 8, 12 (1965).
[25] E. BRAUCKMANN e F. D. BARBIERI, «Arch. Bioq. Quim. Farm.», 8, 227 (1958).
[26] J. BRACHET, «Nature (London)», 181, 1736 (1958).
[27] R. N. STEARNS e A. B. KOSTELLOW, *The chemical basis of development*, W. D. McElroy e B. Glass. Eds., p. 448. J. Hopkins Press, Baltimore (1958).
[28] R. LALLIER, «C. R. Soc. Biol. Paris», 157, 1703 (1963).
[29] P. EMMELLOT, I. J. MIZRAHI, R. NACCARATO e E. L. BENEDETTI, «J. Cell Biol.», 12, 177 (1962).
[30] K. A. STACEY, «Biochem. Biophys. Res. Comm.», 6, 481 (1961).
[31] M. D. EATON e A. R. SCALA, «Exptl. Cell Res.», 33, 481 (1964).
[32] M. D. EATON e A. R. SCALA, «Arch. Ges. Virusforsch.», 7, 274 (1957).

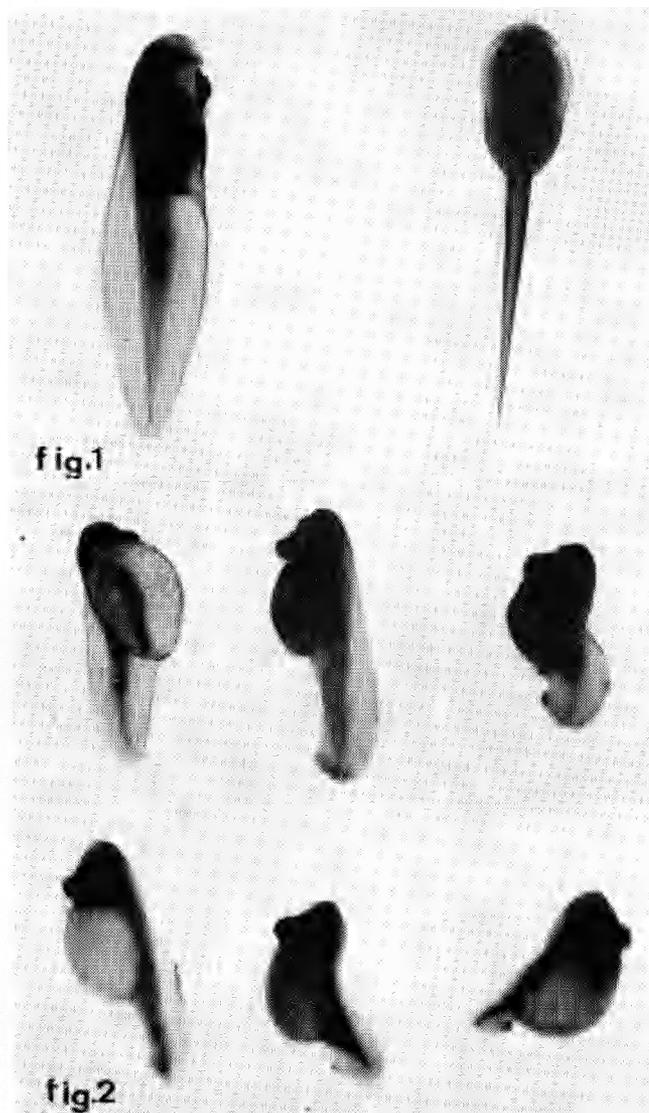


Fig. 1. – Girini controllo di *Discoglossus pictus*.

Fig. 2. – Embrioni trattati con cisteina.