
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIOVANNI VAILATI, PIERANGELA VITALI, SILVIO RANZI

**Azione di solfocianuro di sodio nei primi stadi dello
sviluppo dell'embrione di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.6, p. 594–601.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_6_594_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/>

Zoologia. — *Azione di solfocianuro di sodio nei primi stadi dello sviluppo dell'embrione di pollo* (*). Nota di GIOVANNI VAILATI, PIER-ANGELA VITALI e SILVIO RANZI, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — *Sodium thiocyanate action on the first stages of chick embryo*: The early stages of chick embryos tolerate 0.005 M NaSCN. Acting during primitive streak formation (action in egg), this salt induces a certain number (about 17%) of embryos with enlarged notochord (fig. 1; Plate II, figs. 6, 7, 8, 9, 10, 11). Also the number of notochord cells increases (fig. 2). The volume of these cells is increased too.

In some of these embryos with large notochord, the somites appear to be reduced in volume (Plate IV, figs. 20, 21), following the Amphibian process in which some cells of the presumptive somite rudiment seem to become notochord. Besides this action, the NaSCN disaggregates the somites (Plate III). This disaggregation has been observed in embryos treated since the definitive primitive streak stage (action *in vitro*).

In the neural tube, in embryos with normal notochord, it is possible to observe cell masses that remain enclosed in the neural tube cavity (Plate II, figs. 12, 13), and correspond to the ganglion rudiments observed in Amphibia.

Hydrops are not infrequently observed in the embryo body (Plate IV, fig. 23). A dilatation of the first aortic arch often presses on the brain (Plate I, fig. 2; Plate III, fig. 14; Plate IV, fig. 24).

L'azione morfogenetica del solfocianuro di sodio è stata studiata in diversi animali.

Per quanto concerne i Vertebrati l'effetto dello ione SCN su embrioni di Anfibi si manifesta in un aumento in dimensione della corda dorsale, in ipersviluppo degli abbozzi nervosi, in proliferazioni massicce dell'epidermide ventrale (Ranzi, Tamini e Storari Offer, 1946). Leone (1951), lavorando sul pollo, ha osservato ipersviluppo di tratti del sistema nervoso centrale e proliferazioni all'interno del tubo neurale, cellule sparse nel lume ependimale.

Effettuando il conteggio dei nuclei nella corda e nei somiti di embrioni di *Bufo bufo* e di *Xenopus laevis* trattati allo stadio di tarda blastula con NaSCN, Corti (1950) e Ranzi e Gavarosi (1959) hanno osservato un aumento del numero dei nuclei nella corda. In *Xenopus* il fenomeno è correlato a diminuzione del numero delle cellule che formano i somiti.

Abbiamo studiato l'effetto del NaSCN sui primi stadi dello sviluppo dell'embrione di pollo avvalendoci di una tecnica che permette di controllare stadi di trattamento e concentrazione della sostanza usata. Mediante la tecnica di New (1955) di coltura *in vitro* del giovane embrione di pollo è stato possibile interrompere il trattamento agli stadi voluti e conoscere la concentrazione ottimale del NaSCN capace di provocare le alterazioni di sviluppo.

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano: Contratto C.N.R. n. 70.01160.04.115.448.

(**) Nella seduta del 9 dicembre 1972.

Dopo alcune prove la concentrazione adatta è apparsa il 0,005 M. Abbiamo provato ad aumentare la concentrazione fino a 0,01 M, ma la mortalità oltre 0,006 M è molto elevata. Inoltre, negli embrioni che sopravvivevano, la nota azione tossica aspecifica del sale sembra prevalere.

Gli embrioni sono stati coltivati *in vitro* mediante la tecnica di New (1955) che consente uno sviluppo dei primi stadi dell'embrione perfettamente corrispondente a quello che si osserva *in ovo*; come mezzi nutritivi sono stati usati l'albume fluido e la soluzione di Pannett-Compton (New, 1966); per ulteriori dati sulle manipolazioni vedi: Leani Collini e Ranzi (1967).

Il trattamento con NaSCN ha avuto luogo secondo le seguenti modalità:

A) Uova fecondate di galline livornesi bianche di razza Anak, conservate fino al momento dell'uso in termostato umido a 15°C, sono state incubate a 38,5°C per circa 24 ore, onde raggiungere gli stadi di linea primitiva (stadio 4 secondo Hamburger e Hamilton) e di prolungamento cefalico (stadio 5). Trascorso tale periodo, i blastodermi sono stati espianati *in vitro*: il NaSCN è stato sostituito in quantità isomolare al NaCl della soluzione di Pannett-Compton in modo che la concentrazione fosse 0,005 M; per l'albume veniva preparata una soluzione di NaSCN 0,05 M in acqua bidistillata da diluire con albume in rapporto 1/10, tecnica seguita per studiare l'azione del LiCl da Leani Collini e Ranzi (1967). Il trattamento ha avuto la durata di circa 24 ore, dopo di che gli embrioni sono stati fissati in liquido di Bouin.

B) Affinché il trattamento avvenisse nei primi stadi di sviluppo e data l'estrema difficoltà a espianare *in vitro* blastodermi di stadi precedenti la linea primitiva, la soluzione di NaSCN è stata sostituita *in ovo* all'albume. Veniva preparata una soluzione 0,1 M di NaSCN in acqua bidistillata; praticata poi un'apertura nel guscio del diametro sufficiente a permettere il passaggio di una pipetta, si asportava 1 cc. di albume e lo si sostituiva con 1 cc. della soluzione di NaSCN. Per gli embrioni di controllo si sostituiva all'albume soluzione fisiologica. L'apertura veniva poi richiusa mediante un vetrino coprioggetto saldato con paraffina secondo Rugh (1952) e le uova venivano poste in termostato a 38,5°C.

Dopo circa 24 ore i blastodermi venivano espianati *in vitro* in albume e soluzione di Pannett-Compton normali, in modo da interrompere il trattamento con NaSCN; posti in termostato a 38,5°C gli embrioni venivano fissati dopo un giorno.

C) In una terza serie di esperimenti, circa 24 ore prima di subire il trattamento *in vitro*, si era iniettato nel tuorlo 1 cc di soluzione 0,05 M di NaSCN in acqua bidistillata.

In totale sono stati trattati con NaSCN 232 embrioni; per ogni esperimento venivano espianati circa un numero uguale di embrioni da trattare e di controllo.

Dopo la fissazione la massima parte degli embrioni è stata colorata con antracene blu WR (Gurr) secondo Mahoney (1963) per l'osservazione *in toto*. Altri, per l'analisi istologica, inclusi in paraffina e sezionati trasversalmente: spessore delle sezioni di 10 µ; tali sezioni sono state colorate con ematossilina di Ehrlich ed eosina.

Gli embrioni trattati con 0,005 NaSCN non presentano ad una osservazione superficiale malformazioni molto evidenti. A volte sono leggermente accorciati (Tav. IV, fig. 18), altre presentano una leggera tortuosità degli organi assili (Tav. I, fig. 2). Il cuore pulsa normalmente. Le diverse malformazioni osservate sono le seguenti.

a) *Ipersviluppo della corda dorsale*. Un ipersviluppo della corda è stato osservato in embrioni trattati *in ovo* e cioè prima della comparsa del nodo di Hensen; in embrioni trattati dopo questo stadio mai la corda è apparsa ipersviluppata. Anche alcuni esperimenti condotti allevando *in vitro*, in

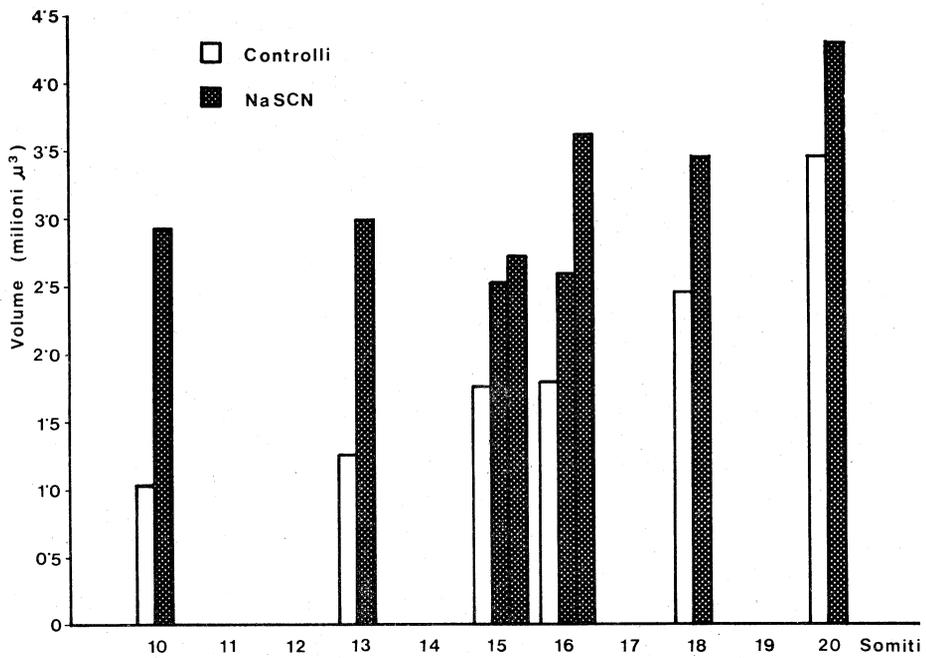


Fig. 1. - Volume della corda (sulle ordinate). Sulle ascisse l'età (numero di somiti).

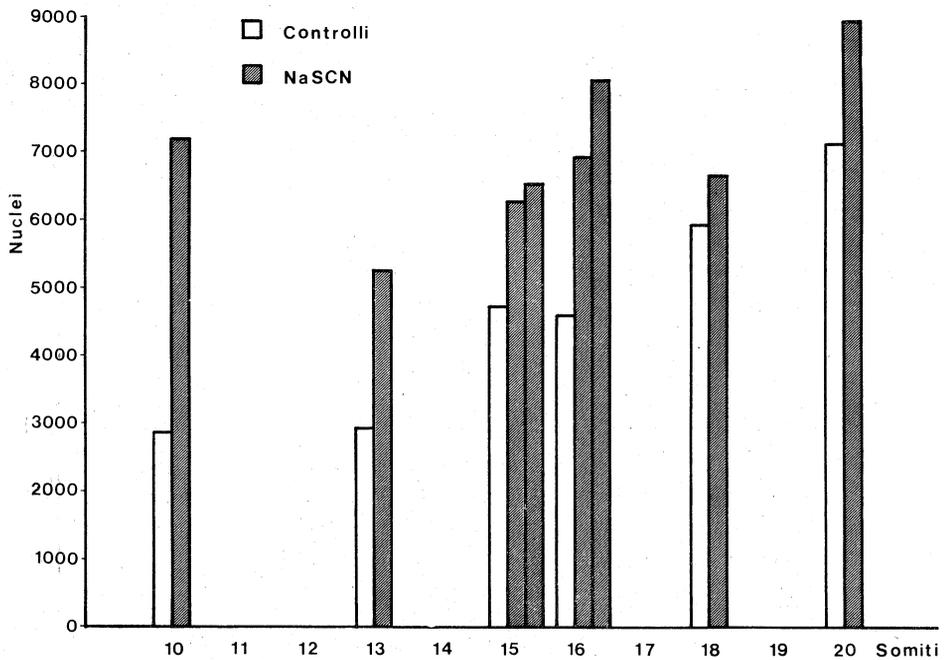


Fig. 2. - Numero di nuclei della corda (sulle ordinate). Sulle ascisse l'età (numero di somiti).

presenza di NaSCN, embrioni allo stadio di giovane linea primitiva non mostrano ingrandimento della corda.

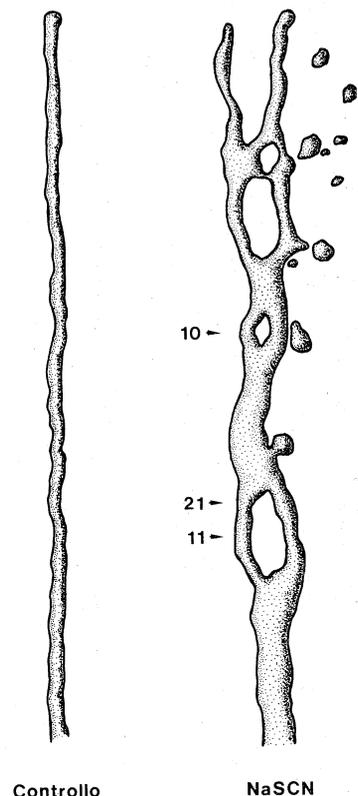
La corda ingrossata è evidente sia nell'embrione osservato *in toto* colorato con blu di antracene (Tav. I, figg. 4, 5) che nelle sezioni (Tav. II); è chiaro che non si è tenuto conto di quegli embrioni nei quali l'aumento del diametro della corda dorsale è imputabile ad un generale accorciamento.

Onde verificare l'effettivo aumento del volume si è proceduto a calcolare il volume della corda nei trattati e nei controlli; ciò è stato possibile tagliando in serie 47 embrioni trattati e 50 controlli, conoscendo lo spessore delle sezioni e misurando l'area della corda lungo tutto l'asse embrionale.

In 8 di questi embrioni abbiamo trovato la corda ingrandita (17,0 % dei casi) (Tav. II, figg. 6, 7, 8, 9). Nelle figg. 1 e 2 sono riportati il volume della corda e il numero delle cellule che la costituiscono. È stato così anche possibile calcolare il volume medio di queste cellule. Il rapporto del volume della corda tra embrioni con corda ingrandita e relativi controlli varia da 1,24 a 2,37 con un massimo 2,76 in un embrione di 10 somiti nel quale la corda appariva ramificata (fig. 3 e Tav. II, figg. 10, 11) e si osservano anche alcuni piccoli noduli isolati che apparivano quali abbozzi di giovani corde, evidentemente simili ai noduli fotografati da Marconnet (1962) in embrioni trattati con urea.

Abbiamo voluto vedere se il numero di cellule fosse più grande negli embrioni con corda ingrandita. Come indice del numero delle cellule abbiamo preso il numero dei nuclei che abbiamo contato. In effetti però tutte le cellule della corda sia negli embrioni trattati che nei controlli sono apparse uninucleate. Il rapporto numero nuclei embrione trattato/controllo variava da 1,12 a 1,94; nel caso di embrione con corda particolarmente grande questo rapporto è 2,47 ⁽¹⁾.

Dividendo il volume della corda per il numero dei nuclei si ottiene un valore che può essere assunto come volume cellulare; questo è $403,8 \pm 17,1$



Controllo

NaSCN

Fig. 3. - Corda ramificata per azione di NaSCN e corda del controllo (in scala) (età 10 somiti) ($\times 80$). I numeri indicano i livelli delle sezioni delle figure delle Tav. II e IV.

(1) Nei controlli il numero dei nuclei della corda tra 13 somiti e 18 raddoppia. Questo può essere preso come argomento in favore di una probabile divisione cellulare di tutte le cellule della corda dorsale, legata a un raddoppiamento in volume dell'organo che effettivamente si osserva nell'accrescimento dall'embrione di 13 a quello di 18 somiti.

per i controlli, $455,0 \pm 20,6$ per i trattati, e cioè più elevato per i trattati sia pure con scarsa significatività.

Da tutto questo si deve dedurre che l'aumento in dimensione della corda dorsale è dovuto ad un aumento del numero delle cellule, al quale si associa un aumento del volume di esse.

b) *Alterazioni dei somiti*. Anche ad una osservazione superficiale si vede che spesso i somiti sono alterati (Tav. I, fig. 2; Tav. III, fig. 14; Tav. IV, figg. 18, 19); essi infatti sono osservabili con difficoltà perché degenerati e i limiti di essi sono difficilmente individuabili (Tav. III, fig. 15).

Nel 62,4 % degli embrioni trattati *in vitro* i somiti appaiono molto ridotti, spesso come disgregati o privi del loro contenuto cellulare (Tav. III); l'unica parte del somite che risente meno dell'azione del NaSCN è il dermatomo (Tav. IV, fig. 22).

È interessante notare che negli embrioni trattati *in vitro* dallo stadio di linea primitiva in poi, i somiti malformati siano solamente i primi cinque o sei e che man mano che si formano i somiti più caudali essi appaiono sempre più di aspetto normale, quasi che il processo di formazione dei somiti subisse un adattamento alla presenza del NaSCN.

Dall'analisi dei somiti di embrioni trattati a diversi stadi si può dedurre che: 1) il NaSCN non induce disgregazione dei somiti già formati; 2) l'effetto malformante di tale sostanza sui somiti è massimo a circa otto ore dall'inizio del trattamento; 3) trascorso tale lasso di tempo la formazione dei somiti apparentemente non risente più della presenza di NaSCN nel mezzo ambiente.

Esistono tuttavia casi nei quali l'assenza dei somiti è totale e altri in cui gli embrioni trattati presentano somiti abbastanza normali.

Negli embrioni trattati *in ovo*, invece, la percentuale dei somiti alterati è del 31,1 % e le malformazioni sono meno imponenti; i somiti, infatti, mantengono la loro struttura normale e sono solo leggermente ridotti in volume e meno compatti. Al riguardo si deve però notare che sono proprio alcuni embrioni con corda grande quelli nei quali i somiti appaiono più piccoli (Tav. IV, figg. 20, 21). Si ritrova cioè nel pollo la condizione posta in evidenza negli Anfibi che il NaSCN sembra indurre la trasformazione di una parte del materiale presuntivamente somitico in cellule cordali.

c) *Malformazioni del tubo neurale*. Già l'osservazione degli embrioni *in toto* dimostra che il tubo neurale presenta qualche caso di asintassia, mentre raramente si osserva platineuria, anche se il midollo spinale è spesso caudalmente aperto.

Le malformazioni più cospicue interessano il 27 % degli embrioni trattati. Frequente è l'ispessimento delle pareti del tubo neurale, specialmente a livello del midollo spinale (Tav. IV, fig. 22); frequente anche la mancata fusione dei lembi della gronda neurale a livello sia dell'encefalo che più caudalmente.

Nel 70,6 % negli embrioni trattati *in vitro*, cioè negli embrioni trattati durante la formazione del tubo neurale, si osservano abbozzi di gangli dorsali. Questi abbozzi sono costituiti da proliferazioni cellulari della volta del rom-

bencefalo e del mesencefalo, spesso così imponenti da riempire completamente il lume del tubo neurale al livello interessato (Tav. II, figg. 12, 13). Esse corrispondono ai gangli, che si osservano indotti per azione di NaSCN in embrioni di Anfibi da Ranzi, Tamini e Storari Offer (1945), secondo quanto ha affermato Leone (1951).

Accanto alle malformazioni sopra elencate si osservano altre malformazioni dell'encefalo dovute ad una dilatazione, spesso notevole, delle aorte cefaliche che comprimono le vescicole ottiche e producono una strozzatura tra diencefalo e mesencefalo (Tav. I, fig. 2; Tav. IV, fig. 24).

d) *Malformazioni del cuore.* Il 26,5% del totale degli embrioni trattati presenta un cuore malformato; nella maggior parte dei casi esso ha aspetto sacciforme (Tav. I, fig. 3; Tav. III, fig. 15; Tav. IV, fig. 19) in quanto l'atrio e il ventricolo non si susseguono secondo la normale ansa, in altri casi esso è poco sviluppato rispetto agli altri organi. In tutti gli embrioni trattati il cuore pulsava.

e) *Dilatazione dell'aorta dorsale.* Come si è già accennato, si osserva una notevole dilatazione dell'aorta nel 27,2% degli embrioni trattati *in vitro*, nel 14,4% dei trattati *in ovo*, e nel 64,7% dei trattati *in ovo* e *in vitro* (Tav. IV, fig. 23). Questa dilatazione è stata vista anche da Jorquera e Rossi (1965) lavorando con concentrazioni di NaSCN doppie delle nostre e pertanto più tossiche.

Nella zona cefalica, a destra ed a sinistra dove l'arco aortico piega dorsalmente, si viene a formare una dilatazione che caudalmente al diencefalo strozza il mesencefalo (Tav. I, fig. 2; Tav. III, fig. 14; Tav. IV, fig. 24). Mentre nella regione del tronco i due rami dell'aorta dorsale sono dilatati ma non provocano malformazioni a carico degli organi vicini.

f) *Vescicole da edema e altre malformazioni.* Vescicole da edema, osservate anche da Marconnet (1962) in embrioni di pollo trattati con urea, si possono notare a tutti i livelli dell'embrione e spesso, lateralmente ai somiti, hanno uno sviluppo considerevole (Tav. IV, fig. 23).

Infine, nel 32,7% del totale degli embrioni trattati si osservano casi di ritardo di sviluppo, tra i quali includiamo i casi di accorciamento dell'asse embrionale e qualche inibizione di sviluppo.

Le isole sanguigne sono ben riconoscibili e di regola di dimensione normale.

CONSIDERAZIONI

L'ingrandimento della corda dorsale indotto da NaSCN è stato osservato negli embrioni trattati *in ovo* prima del completo differenziamento della linea primitiva. Negli embrioni trattati *in vitro*, e cioè posti in coltura e trattati a partire dallo stadio di linea primitiva, mai è stato osservato. Questo dato si accorda con le osservazioni eseguite sugli Anfibi nei quali per ottenere un ingrandimento della corda è necessario agire in stadi molto precoci, e cioè cominciare ad agire prima della comparsa del labbro dorsale del blastoporo. Si può probabilmente fare un parallelo: actinomicina e daunomicina, agendo

su embrioni a partire dallo stadio di linea primitiva, difficilmente riescono a far scomparire la corda (Leani Collini e Ranzi, 1967), e cioè i messaggeri di questa sono a questo stadio in un processo di formazione avanzata. Per ottenere un ingrandimento della corda con NaSCN occorre agire in stadio più precoce, si può pensare quando i messaggeri sono in via di formazione.

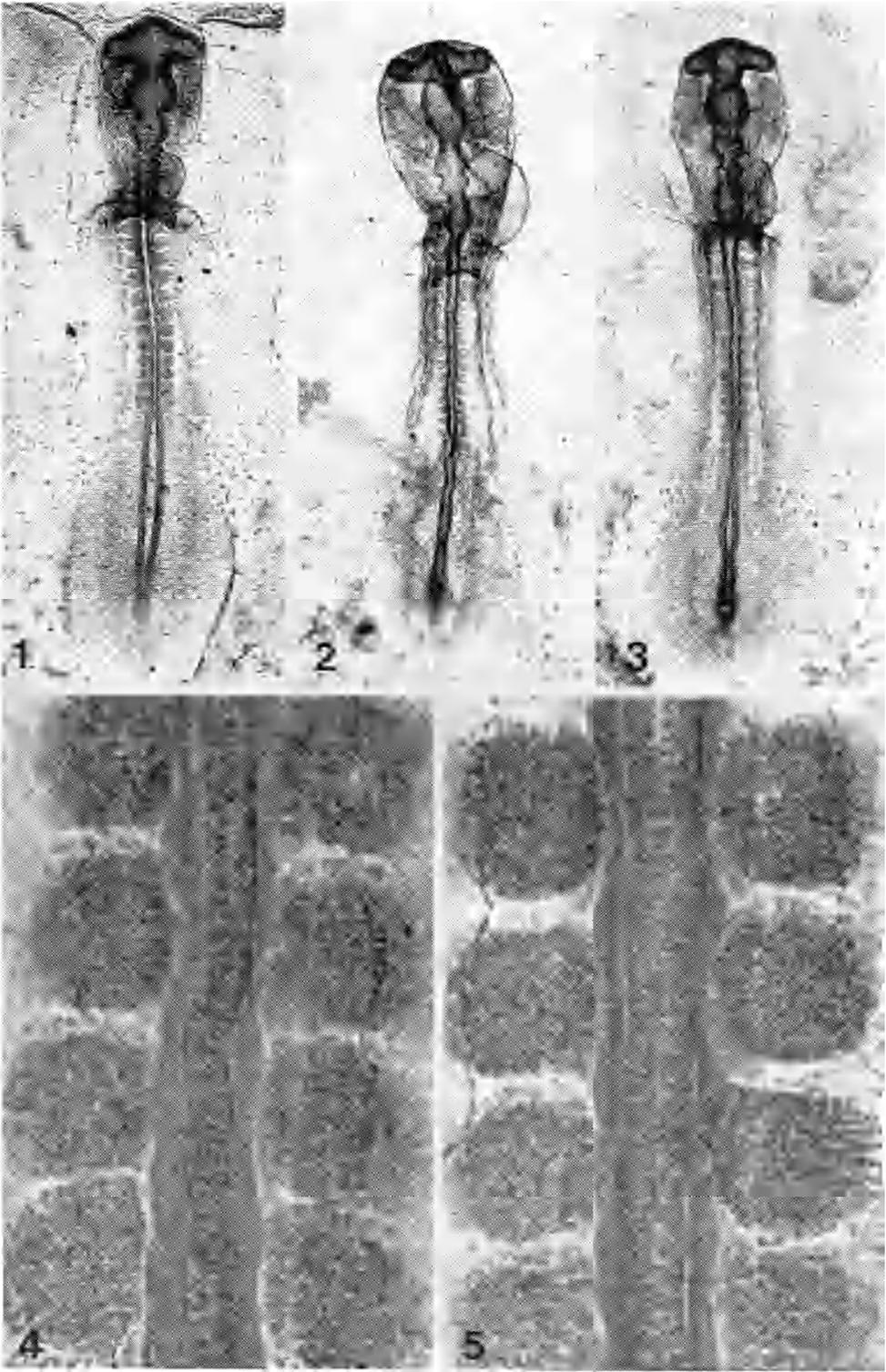
L'azione del solfocianuro porta le cellule dei somiti a non essere saldamente unite ed a separarsi. Ne risultano somiti svuotati. Questo fenomeno avviene in embrioni trattati con NaSCN *in vitro* allo stadio di linea primitiva e pertanto non è in rapporto a ingrandimento della corda.

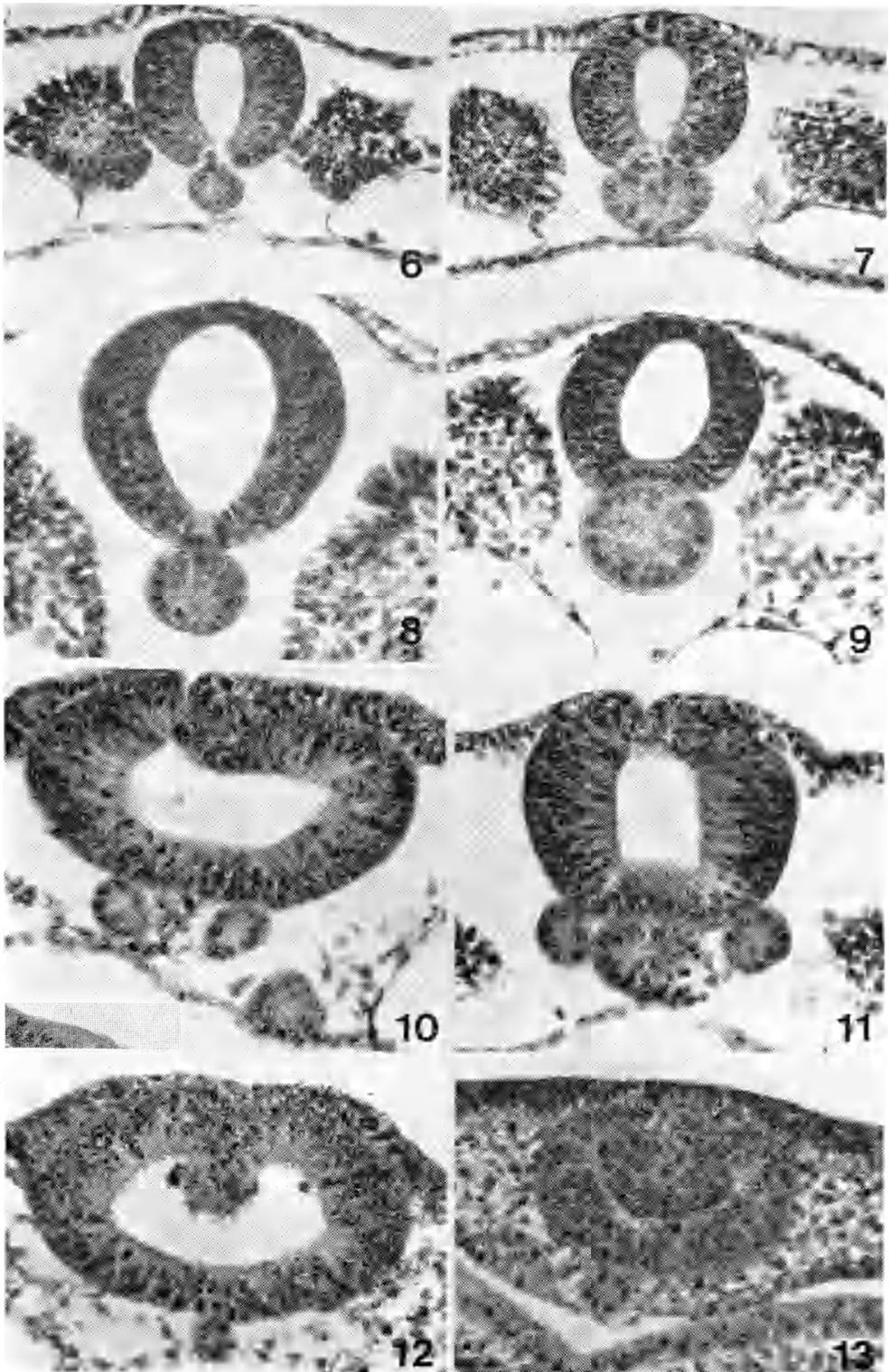
Negli embrioni, però, che presentano corda più grande del normale, non è infrequente osservare somiti più piccoli. Questo fenomeno, che nulla ha a che fare con quello precedentemente descritto, sembra essere quello descritto negli Anfibi e cioè in rapporto alla trasformazione di una parte di materiale somitico in materiale cordale per azione del NaSCN.

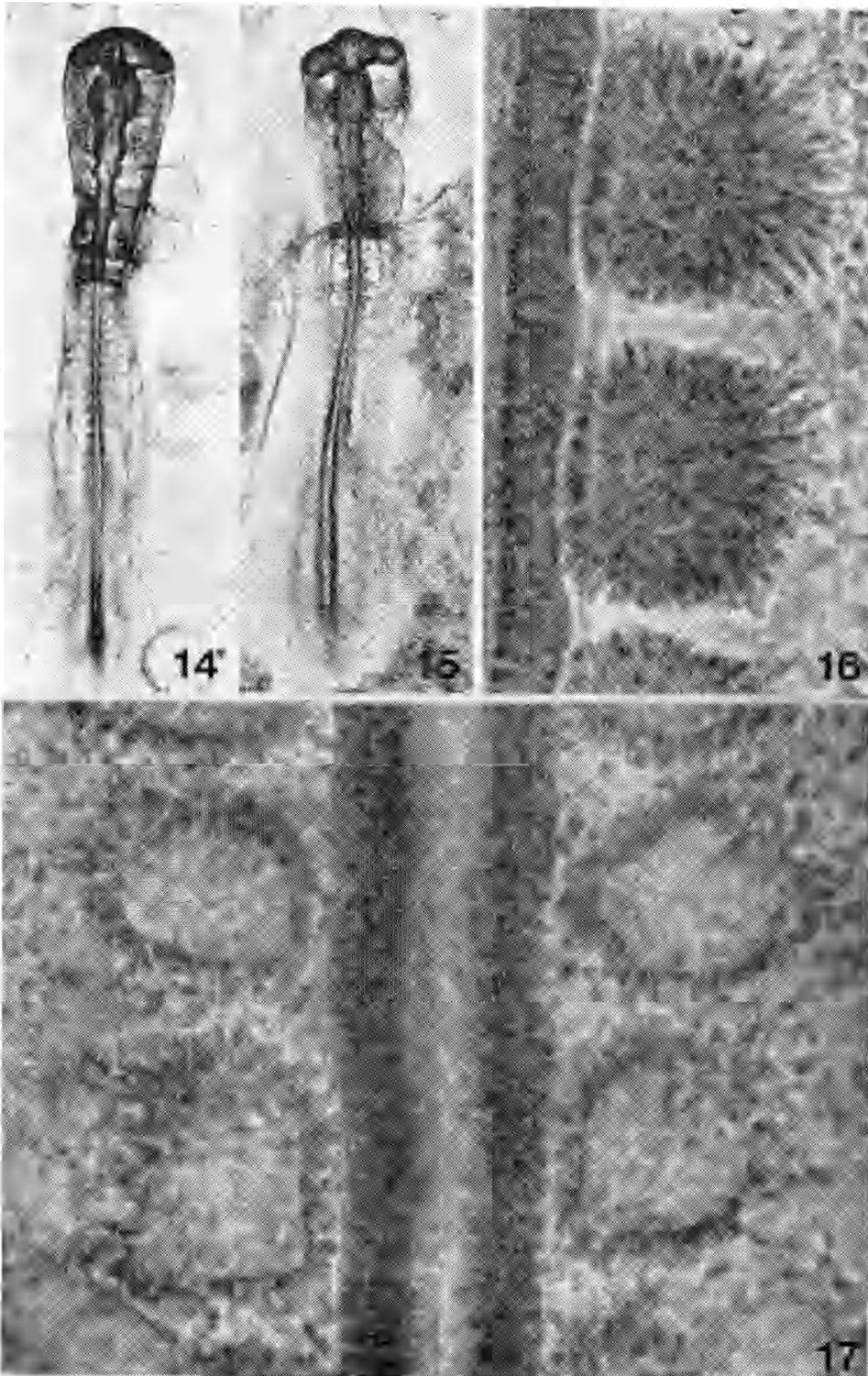
Gli abbozzi di gangli, che fanno ernia nel lume del tubo neurale, non si osservano in embrioni con corda grande. Una correlazione tra essi e l'ingrandimento della corda in questi embrioni non esiste. Sembra piuttosto si debba pensare al NaSCN, che agisce direttamente quale induttore, come avviene negli espianti ventrali di embrioni di Anfibi secondo le ricerche di Ranzi e Tamini (1940).

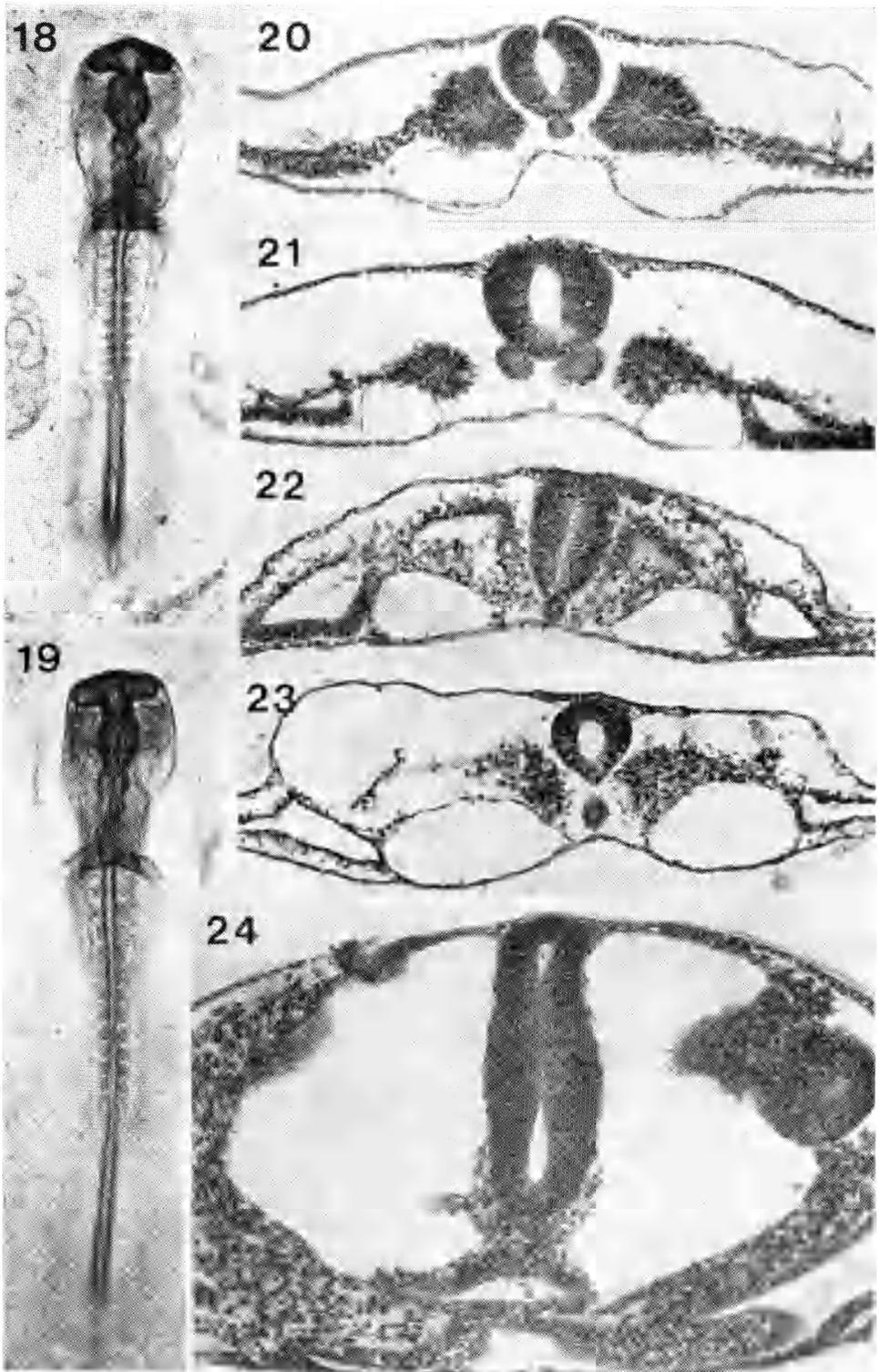
LAVORI CITATI

- CORTI C. (1950) - *Ricerche sull'ipersviluppo della corda e iperinduzione degli Anfibi*, « Riv. Biol. », 42, 443.
- HAMBURGER W. e HAMILTON H. L. (1951) - *A series of normal stages in the development of the chick embryo*, « J. Morphol. », 88, 49.
- HAMILTON H. L. (1952) - *Lillie's development of the chick*, « III ed., Holt, Rinehart and Winston, New York ».
- JORQUERA B. e ROSSI A. (1965) - *Sull'azione del tiocianato di sodio nello sviluppo dell'embrione di pollo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. fis.) », [8], 38, 938.
- LEANI COLLINI R. e RANZI S. (1967) - *Effetto di actinomicina D, daunomicina, puromicina e litio cloruro sui primi stadi dello sviluppo embrionale del pollo*, « Atti Acc. Naz. Lincei (Mem. Sc. fis.) », [8] 8, 47.
- LEONE V. (1951) - *Effetti del trattamento con solfocianato di sodio su embrioni di pollo*, « Monit. Zool. Ital. », 59 suppl., 211.
- MAHONEY R. (1963) - *The use of antracene blue for staining whole mount zoological material*, « J. Sc. Technol. », 9, 154.
- MARCONNET R. (1962) - *Action de l'urée sur le développement embryonnaire du pulelet*, « présentée à la Faculté de Medecine de Nancy » e non altrimenti pubblicato.
- NEW D. A. T. (1955) - *A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro*, « J. Embryol. exp. Morph. », 3, 310.
- NEW D. A. T. (1966) - *The culture of Vertebrate embryos*, Academic Press N. Y.
- RANZI S. e GAVAROSI G. (1959) - *Dimensions of the notochord and somites in embryos of Xenopus laevis treated with thiocyanate*, « J. Embryol. exp. Morph. », 7, 117.
- RANZI S. e TAMINI E. (1940) - *Azione di NaSCN sullo sviluppo di embrioni di Anfibi*. II, « R. Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », 73, 525.
- RANZI S., TAMINI E. e STORARI OFFER E. (1946) - *Alterazione dello sviluppo embrionale di Anfibi prodotte da solfocianato e da altre sostanze*, « Ist. Lomb. Rend. Sc. », 79, 161.
- RUGH R. (1952) - *Experimental Embryology*, « Burgess Pub. Comp. Minneapolis Min. ».









SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I

Figg. 1-3 ($\times 22$); Figg. 4, 5 ($\times 260$).

- Fig. 1. - Embrione controllo allevato *in vitro*.
 Figg. 2, 3. - Embrioni trattati (2: a partire da piega cefalica; 3: a partire da linea primitiva).
 Fig. 5. - Embrione *in toto*; inizio trattamento prima dell'incubazione dell'uovo. La corda è ingrandita. La fig. 4 è il controllo.

TAVOLA II

($\times 320$).

- Fig. 6. - Stadio 13 somiti; controllo della fig. 7.
 Fig. 7. - Inizio di trattamento prima dell'incubazione dell'uovo; età 13 somiti. La corda è ingrandita.
 Fig. 8. - Stadio 22 somiti; controllo della fig. 9.
 Fig. 9. - Inizio di trattamento prima dell'incubazione dell'uovo; età 22 somiti. La corda ingrandita.
 Figg. 10, 11. - Inizio trattamento prima dell'incubazione dell'uovo; età 10 somiti. La corda nella regione è duplice e nella fig. 10, a destra, è un nodulo cordale.
 Figg. 12, 13. - Inizio trattamento: fig. 12 piega cefalica (età 18 somiti); fig. 13 linea primitiva (età 15 somiti). Massa cellulare che si accresce nel lume neurale.

TAVOLA III

Figg. 14, 15 ($\times 22$); Figg. 16, 17 ($\times 430$).

- Fig. 14. - Inizio trattamento 3 somiti, sono i primi tre che non hanno risentito dell'azione del NaSCN.
 Fig. 15. - Inizio trattamento linea primitiva.
 Fig. 17. - Particolare ingrandito dell'embrione della fig. 14 (6° e 7° paio di somiti profondamente disgregati). La fig. 16 è il controllo del lato destro.

TAVOLA IV

Figg. 18, 19 ($\times 22$); Figg. 20-24 ($\times 170$).

- Figg. 18, 19. - Inizio trattamento linea primitiva.
 Fig. 21. - Inizio trattamento prima dell'incubazione dell'uovo (età 10 somiti). Corda ramificata. Somiti ridotti. La fig. 20 è il controllo.
 Figg. 22, 23. - Inizio trattamento piega cefalica (età 18 somiti).
 Fig. 24. - Inizio trattamento linea primitiva (15 somiti).