

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

ROSALBA LANZANI MACI, CRISTINA SOTGIA

## **Cambiamenti della precoce determinazione embrionale e sintesi di acido ribonucleico e di proteine nell'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. 602–607.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_53\\_6\\_602\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_6_602_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.** — *Cambiamenti della precoce determinazione embrionale e sintesi di acido ribonucleico e di proteine nell'embrione di pollo* (\*). Nota di ROSALBA LANZANI MACI e CRISTINA SOTGIA, presentata (\*\*\*) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — The influence of LiCl and NaSCN on RNA and protein syntheses in chick embryos has been studied.

Chick embryos at various early stages were *in vitro*-explanted according to New, treated with 0.01 M LiCl or 0.006 M NaSCN, and put in culture in the presence of tritiated uridine or leucine.

The incorporation in treated embryos and in controls has been studied with an autoradiographic method.

The tritiated uridine incorporation in LiCl-treated embryos is less than the incorporation in the controls. The same thing occurs in NaSCN-treated embryos.

The incorporation of tritiated leucine is less in LiCl-treated embryos, but NaSCN-treated embryos do not show appreciable differences from the controls.

These results confirm that lithium inhibits protein synthesis during the first stage of chick embryonic development.

The NaSCN, instead, inhibits RNA synthesis but does not inhibit protein synthesis. This discovery seems to agree with Ranzi's interpretation that the alterations induced by NaSCN are related to an increase of amino-acid pool, an increase induced by protein denaturation, the effect of NaSCN action.

È noto che il LiCl ed il NaSCN provocano alterazioni dello sviluppo a carico del sistema nervoso, della corda e dei somiti, se somministrati durante i primi stadi dello sviluppo embrionale del pollo. Il LiCl induce riduzione della corda dorsale, del sistema nervoso e conseguentemente dell'encefalo, sviluppo dei somiti con fusione di questi sulla linea mediana del corpo (Nicolet, 1961; Leani Collini e Ranzi, 1966).

Il NaSCN induce ipersviluppo della corda dorsale, riduzione dei somiti (Vailati, Vitali e Ranzi, 1972).

Il meccanismo d'azione di queste sostanze non è tuttavia ancora completamente chiarito, sebbene esistano alcune ricerche che mettono in luce alcuni punti (Ranzi 1955, 1962; Roger 1964; Flickinger *e coll.*, 1970). La presente ricerca condotta con metodo autoradiografico su embrioni di pollo coltivati *in vitro* ha lo scopo di apportare ulteriori dati per la chiarificazione di questo problema.

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università Statale di Milano usufruendo del contratto di ricerca del CNR n. 71.00235.04.115448.

(\*\*) Nella seduta dell'11 novembre 1972.

a) *Trattamento con LiCl.* – Uova embrionate di pollo sono state incubate in termostato a 38,5°C per 24 ore fino a raggiungere lo stadio di linea primitiva processo cefalico (stadi secondo Hamburger–Hamilton). A questo stadio gli embrioni sono stati espianati *in vitro* secondo la tecnica di New che permette di ricostruire un ambiente simile al naturale, in quanto si ha come terreno di coltura albume fluido e come mezzo nutritizio una soluzione fisiologica (Pannet–Compton).

Gli espianati sono stati divisi in due lotti: controlli e trattati. Ai trattati è stato aggiunto nella soluzione di Pannet–Compton e nell'albume LiCl fino ad una concentrazione di 0,01 M nel liquido di coltura. I due lotti sono stati posti in termostato a 38,5°C ed incubati per 12 ore; poi è stata aggiunta a tutti gli embrioni o uridina tritiata (25 µC per embrione) o leucina tritiata (10 µC per embrione). Sono stati lasciati sempre in termostato un'ora a contatto con la sostanza marcata, dopo di che sono stati ripetutamente lavati con soluzione fisiologica per eliminare la sostanza marcata non incorporata, e quindi fissati in liquido di Carnoy.

b) *Trattamento con NaSCN.* – Uova embrionate di pollo sono state espianate *in vitro* secondo New e divise in due lotti: controlli e trattati con NaSCN 0,006 M.

Ad entrambi sono stati aggiunti o uridina tritiata (5 µC per embrione) o leucina tritiata (5 µC per embrione) ed incubati in termostato a 38,5°C per 48 ore. Al termine dell'incubazione gli embrioni dopo ripetuti lavaggi in soluzione fisiologica sono stati fissati in liquido di Carnoy.

c) *Allestimento dei preparati autoradiografici.* – Dagli embrioni fissati ed inclusi in paraffina sono state fatte sezioni seriate dello spessore di 5 µ. Sulle sezioni poste su vetrini accuratamente puliti CCl<sub>4</sub>, e sparaffinate è stato steso uno «stripping film» Kodak AR 10. I preparati sono posti al riparo della luce in camera fredda (± 2°C) per 5 giorni, tempo necessario per far sì che la lastra sia impressionata, e quindi sviluppati con i comuni metodi fotografici e colorati con ematossilina di Ehrlich.

L'incorporazione dei precursori marcati appare nei preparati autoradiografici come grani neri. Per valutare l'influenza sulle sintesi dell'RNA e delle proteine del LiCl e del NaSCN, sono stati effettuati numerosi conteggi dei grani nel tubo neurale, nella corda e nei somiti. Si eseguivano i conteggi su due sezioni consecutive ogni dieci lungo l'intero asse dell'embrione; si calcolava poi la media aritmetica dei dati ottenuti. La validità dei dati è stata controllata calcolando lo scarto quadratico medio e procedendo all'analisi della varianza.

*Embrioni trattati con LiCl.* – Gli embrioni trattati con LiCl mostrano le malformazioni caratteristiche provocate da questo sale e cioè mancata chiusura del tubo neurale, somiti malformati, ecc.

Altrettanto evidente appare nelle autoradiografie l'influenza del LiCl sulla sintesi dell'RNA e delle proteine. Infatti in embrioni trattati con LiCl 0,01 M e posti ad incorporare uridina tritiata o leucina tritiata, l'incorporazione dei precursori marcati è notevolmente abbassata rispetto ai controlli.

Nella Tabella I sono riportati i valori che rappresentano le medie aritmetiche di conteggi di grani effettuati in aree standard di 100 µ<sup>2</sup>. L'incorporazione di uridina tritiata è presa come indice della sintesi di RNA (SRNA) e quella di leucina tritiata come indice della sintesi di proteine (SP).

TABELLA I

*Trattamento con LiCl 0,01 M per 18 ore e successiva incubazione con uridina tritiata per 1 ora (SRNA)*

	Controllo	LiCl	LiCl/Controllo
Sistema nervoso . . . . .	46,31 ± 3,63	58,78 ± 3,50	1,26
Corda . . . . .	41,95 ± 3,40	30,55 ± 1,72	0,72
Somiti . . . . .	46,41 ± 3,93	40,80 ± 1,42	0,87

*Trattamento con LiCl 0,01 M per 18 ore e successiva incubazione con leucina tritiata per 1 ora (SP)*

	Controllo	LiCl	LiCl/Controllo
Sistema nervoso . . . . .	59,97 ± 1,27	42,52 ± 1,06	0,70
Corda . . . . .	50,72 ± 1,67	39,15 ± 2,50	0,77
Somiti . . . . .	60,79 ± 2,30	41,67 ± 1,26	0,68

L'analisi della varianza mostra un'alta significatività ( $0,05 > P > 0,01$ ). Calcolando il rapporto tra il valore di incorporazione della leucina e quello della uridina si ottengono i dati sotto riportati, che vengono presi come espressione del rapporto tra sintesi proteica e sintesi di RNA (SP/SRNA).

	Controllo	LiCl	LiCl/Controllo
Sistema nervoso . . . . .	1,29	0,72	0,55
Corda . . . . .	1,21	1,28	1,05
Somiti . . . . .	1,31	1,02	0,77

Negli embrioni trattati con LiCl 0,01 M il rapporto in questione è minore o uguale (corda) a quello dei controlli.

*Embrioni trattati con NaSCN 0,006 M.* - Gli embrioni trattati con NaSCN mostrano le note malformazioni provocate dal sale in questione e cioè somiti disgregati, ispessimento delle pareti del tubo neurale, ecc. Inoltre i valori di incorporazione di uridina tritiata negli embrioni trattati sono inferiori ai controlli, mentre quelli ottenuti dopo incubazione con leucina tritiata non mostrano significative differenze rispetto ai controlli.

Nella Tabella II sono riportati i valori che rappresentano medie aritmetiche di conteggi di grani effettuati in aree standard di  $100 \mu^2$  per incorporazione di uridina e leucina tritiata.

TABELLA II

*Trattamento con NaSCN 0,006 M e con uridina tritiata per 48 ore (SRNA)*

	Controllo	NaSCN	NaSCN/Controllo
Sistema nervoso . . . . .	72,21 $\pm$ 1,74	58,15 $\pm$ 1,13	0,80
Corda . . . . .	67,63 $\pm$ 1,68	55,69 $\pm$ 1,31	0,82
Somiti . . . . .	71,33 $\pm$ 2,01	56,18 $\pm$ 1,56	0,78

*Trattamento con NaSCN 0,006 M e con leucina tritiata per 48 ore (SP)*

	Controllo	NaSCN	NaSCN/Controllo
Sistema nervoso . . . . .	76,69 $\pm$ 4,31	74,88 $\pm$ 4,20	0,97
Corda . . . . .	70,04 $\pm$ 3,80	71,85 $\pm$ 4,15	1,02
Somiti . . . . .	74,36 $\pm$ 3,82	73,95 $\pm$ 4,80	0,99

L'analisi della varianza per l'uridina mostra un'alta significatività ( $0,05 > P > 0,01$ ).

Il maggior valore di incorporazione dei controlli rispetto a quelli della Tabella I corrisponde ad una maggiore durata del trattamento con la sostanza marcata (48 ore invece di 1 ora).

Calcolando il rapporto tra i valori di incorporazione della leucina e dell'uridina si ottengono i dati sotto riportati che si suppone rappresentino il rapporto sintesi proteica-sintesi RNA (SP/SRNA).

	Controllo	NaSCN	NaSCN/Controllo
Sistema nervoso . . . . .	1,06	1,28	1,20
Corda . . . . .	1,03	1,28	1,24
Somiti . . . . .	1,04	1,31	1,25

Gli embrioni trattati con NaSCN 0,006 M mostrano dunque un'attività, intesa come rapporto tra sintesi proteica e sintesi di RNA, più elevata rispetto ai controlli.

Se si prende in esame il rapporto sintesi proteica/sintesi RNA si osserva che questo rapporto è rispetto ai controlli più basso per effetto del LiCl più elevato per effetto del NaSCN.

I dati della Tabella I dimostrano che il LiCl deprime le sintesi proteiche durante le prime fasi dello sviluppo embrionale del pollo, mentre il NaSCN non ha questa azione. I nostri risultati per il LiCl sono in accordo con quelli riportati da altri ricercatori, alcuni dei quali però hanno visto un incremento assoluto della sintesi di proteine indotta da NaSCN.

Roger (1964), lavorando su embrioni di pollo, ha trovato un'inibizione della sintesi di RNA e delle proteine in embrioni trattati con LiCl ed un notevole incremento della incorporazione di glicina C<sup>14</sup> ma non di adenina negli embrioni trattati con NaSCN.

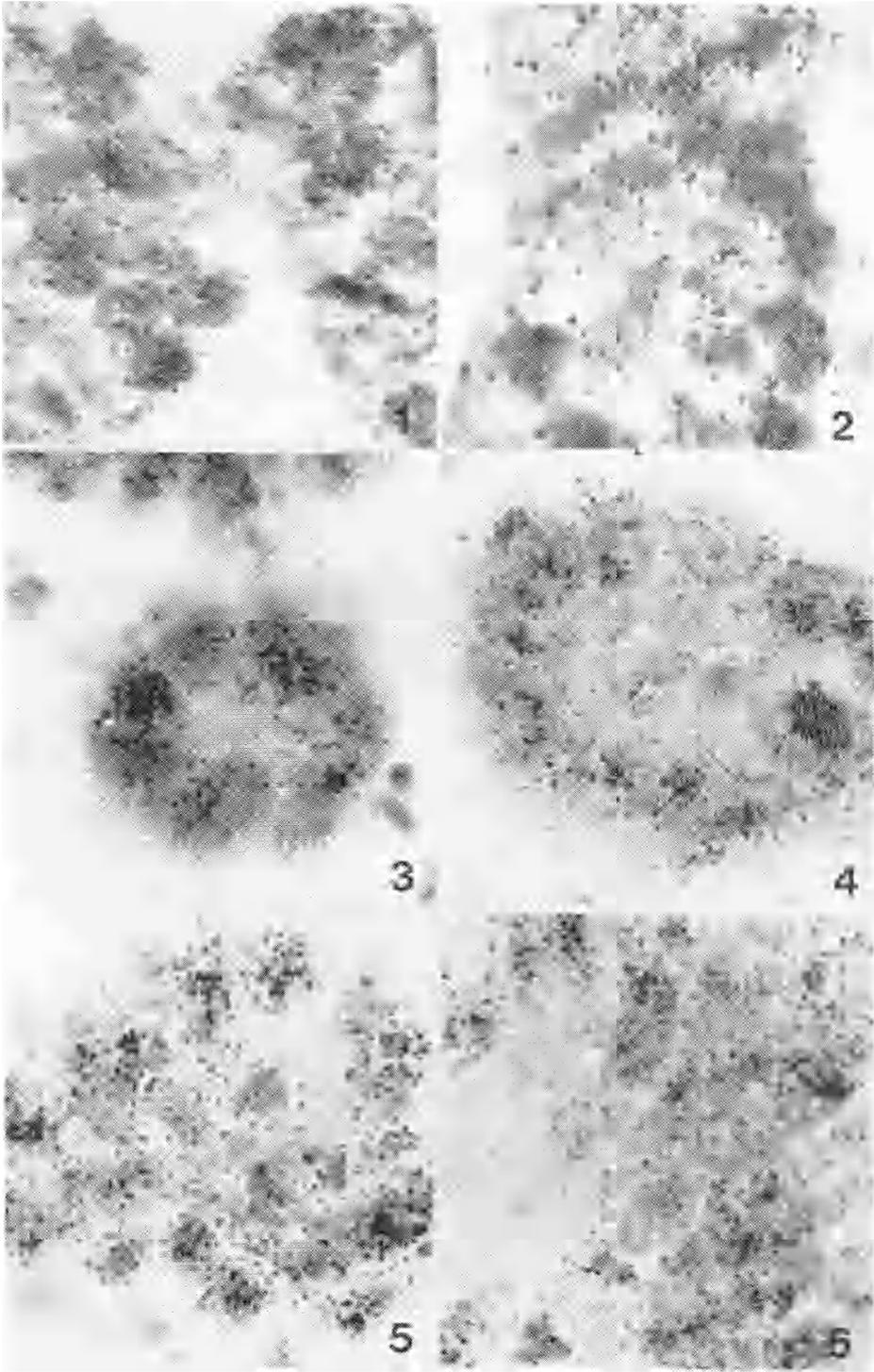
De Bernardi, Leonardi Cigada, Maci e Ranzi (1969) hanno osservato un abbassamento della sintesi dell'RNA e delle proteine in embrioni di anfibio trattati con LiCl.

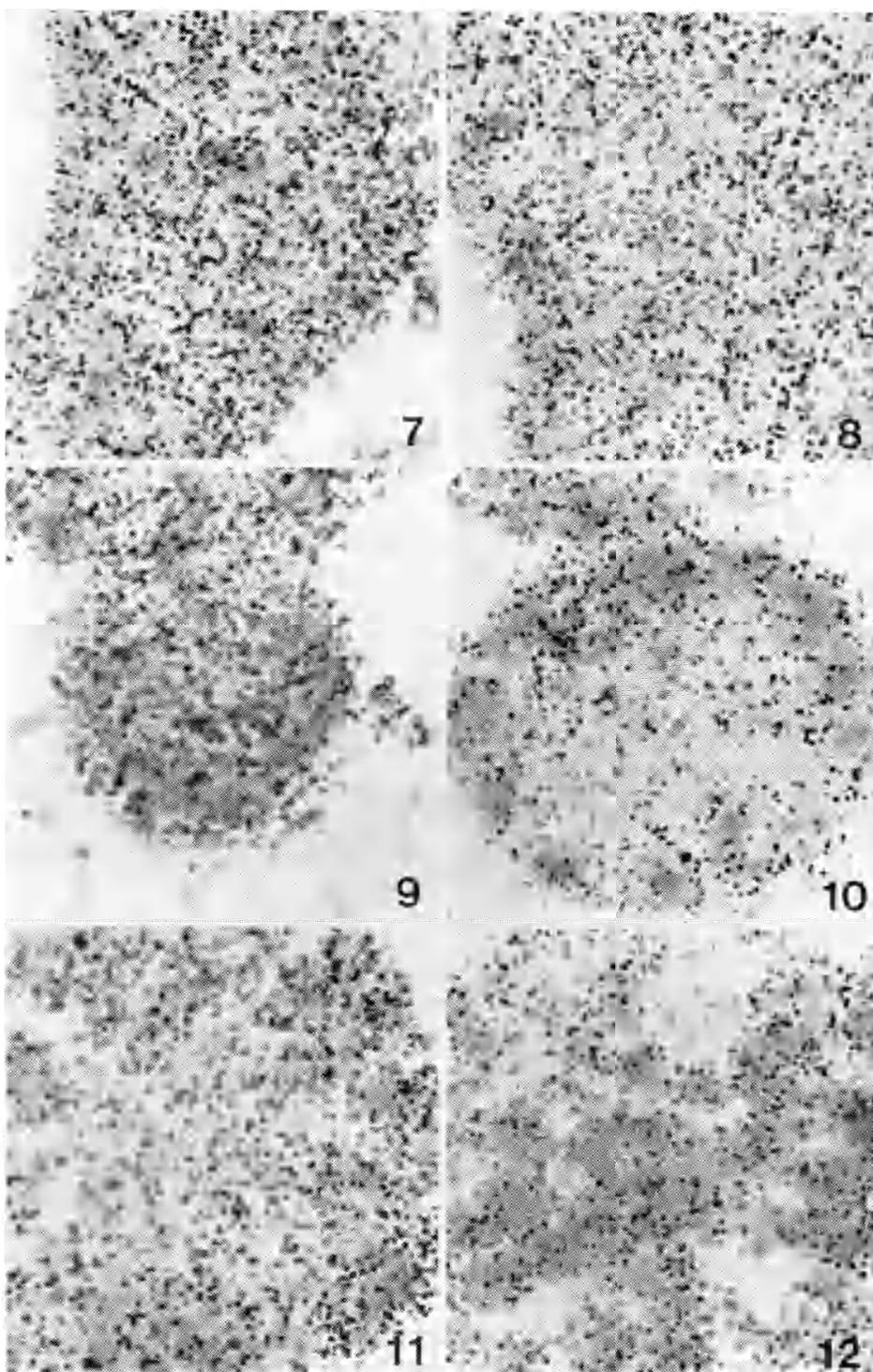
Flickinger (1970), sempre in embrioni di anfibio trattati con LiCl, ha trovato una diminuzione dell'RNA totale ed un incremento in embrioni trattati con NaHCO<sub>3</sub>, agente che induce azione simile a NaSCN.

Le nostre ricerche, in quanto dimostrano una inibizione del NaSCN sulla sintesi dell'RNA nell'embrione di pollo mentre l'intensità della sintesi proteica non cambia negli embrioni così trattati, sembrano in accordo con l'interpretazione di Ranzi (1962) che attribuì le alterazioni dovute al NaSCN ed agli agenti che come esso agiscono, ad un incremento degli aminoacidi disponibili per la sintesi proteica, incremento in rapporto alla denaturazione proteica indotta da NaSCN. Nelle nostre ricerche, infatti, quello che aumenta del 20-25 % è il rapporto sintesi di proteine/sintesi di RNA.

#### LAVORI CITATI

- DE BERNARDI F., LEONARDI CIGADA M., MACI R. e RANZI S. (1969) - *On protein Synthesis During the Development of Lithium-Treated Embryos*, « *Experientia* », 25, 211.
- FLICKINGER R. A., LAUTH M. R. e STAMBROOK P. J. (1970) - *An inverse relation between the rate of cell division and RNA synthesis per cell in developing frog embryos*, « *J. Embryol. Exp. Morph.* », 23, 3, 571.
- HAMBURGER V. e HAMILTON H. L. (1951) - *A serie of normal stages in the development of the chick embryo*, « *J. Morphol.* », 88, 49.
- LEANI COLLINI R. e RANZI S. (1966) - *Effetto di actinomicina, daunomicina, puromicina e litio cloruro sui primi stadi dello sviluppo embrionale di pollo*, « *Atti Acc. Naz. Lincei, Mem. Sc. Fis.* », (8) 8, 3, 47.
- NICOLET G. (1961) - *Action du LiCl sur de jeunes blastoderm de poulet cultivés in vitro*, « *Experientia* », 17, 413.
- NEW D. A. T. (1955) - *A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro*, « *J. Embryol. Exp. Morphol.* », 3, 326.
- RANZI S. (1955) - *Le macromolecole nella determinazione embrionale*, « *Ist. Lombardo, Rend. Sc.* », 89, 200.
- RANZI S. (1962) - *The proteins in embryonic and larval development*, « *Adv. in Morphog.* », 2, 211.
- ROGER K. T. (1964) - *Radioautographic Analysis of the Incorporation of the Protein and Nucleic Acid Precursors into Various Tissues of Early Chick Embryos Cultured in Toto on Medium Containing LiCl*, « *Develop. Biol.* », 9, 176.
- VAILATI G., VITALI P. e RANZI S. (1972) - *Azione di solfocianuro di sodio nei primi stadi dello sviluppo dell'embrione di pollo*. « *Rend. Acc. Naz. Lincei, (Sc. fis.)* », (8) 53, 594-601.





## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

## TAVOLA I

Espianto linea primitiva. Trattamento per 1 ora con 25  $\mu$ C di uridina tritiata. ( $\times 1550$ ).

- Fig. 1. - Controllo tubo neurale 46,31 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 2. - 0.01 M LiCl tubo neurale 58,78 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 3. - Controllo corda 41,95 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 4. - 0.01 M LiCl corda 30,55 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 5. - Controllo somiti 46,41 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 6. - 0.01 M LiCl somiti 40,80 grani/100  $\mu^2$ .

## TAVOLA II

Espianto uova fecondate. Trattamento per 48 ore con 5  $\mu$ C di uridina tritiata. ( $\times 1550$ ).

- Fig. 7. - Controllo tubo neurale 72,21 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 8. - 0,006 M NaSCN tubo neurale 58,15 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 9. - Controllo corda 67,63 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 10. - 0,006 M NaSCN corda 55,69 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 11. - Controllo somiti 71,33 grani/100  $\mu^2$ .
- Fig. 12. - 0,006 M NaSCN somiti 56,18 grani/100  $\mu^2$ .