
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

LORETO ROSSI, PAOLA SALVINI, GIOVANNA VITAGLIANO
TADINI

**Azione della 8-idrossichinolina sugli embrioni di
Asellus aquaticus L. (Crust. Isop.): Analisi della
variazione del ciclo mitotico**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 59 (1975), n.5, p. 499–504.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1975_8_59_5_499_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/>

Citologia. — *Azione della 8-idrossichinolina sugli embrioni di Asellus aquaticus L. (Crust. Isop.): Analisi della variazione del ciclo mitotico* ^(*). Nota di LORETO ROSSI, PAOLA SALVINI e GIOVANNA VITAGLIANO TADINI, presentata ^(**) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The action of 8-hydroxyquinoline citrate on cleavage mitosis of *Asellus aquaticus* L. (Crust Isop.) embryos is studied.

An exact picture of chromosomal aberration, metaphase arrest, and a decrease of the transition rate between the different mitotic stages are the most evident effects of the substance.

Finally the function of mitotic spindle inhibitor of 8-hydroxyquinoline is discussed.

In questa Nota preliminare riportiamo i primi risultati ottenuti somministrando 8-idrossichinolina a giovani embrioni di *Asellus aquaticus* L.

È noto che la chinolina ed i suoi derivati provocano ([1, 2, 4] nelle cellule in divisione, turbe della mitosi, distruzione delle fibre del fuso, blocco della centrosfera ed alterazione dei cromosomi oltre ad un notevole effetto tossico che produce la completa sparizione di ogni attività mitotica. Questa serie di fenomeni è stata ed è tuttora l'oggetto di numerose ricerche in differenti tipi di cellule sia vegetali [3, 4] sia animali [1, 5]. Ci è parso pertanto opportuno sottoporre all'azione di mitoclasici di questo genere, cellule embrionali di Crostaceo e studiarne l'eventuale danno e la misura; se cioè il danno sia paragonabile a quello che si verifica in altri animali.

MATERIALE E METODO

Gli esperimenti sono stati condotti su embrioni di *A.a.* coltivati *in vitro*.

Il kariogramma di questa specie ($n = 8$; $2n = 16$) è costituito da sette coppie di cromosomi metacentrici o submetacentrici e di una coppia di subtelocentrici [6]. Le uova fecondate, ottenute da 16 ♀♀ sorelle, venivano prelevate dal marsupio materno appena partorite e poste in coltura *in vitro*, secondo una tecnica già riportata in un precedente lavoro [7] tenendo separate le singole figliate. Al quinto giorno di sviluppo ⁽¹⁾, metà degli embrioni di ogni femmina subiva il trattamento con 8-idrossichinolina citrato (P.M. 337,28) allo 0,6 %, la restante metà era tenuta come controllo.

(*) Lavoro eseguito presso il Centro di Genetica Evoluzionistica (C.N.R.), presso lo Istituto di Genetica dell'Università di Roma, diretto dal Prof. G. Montalenti.

(**) Nella seduta del 15 novembre 1975.

(1) Questo stadio coincide con l'inizio del differenziamento a livello istologico ed in base a dati bibliografici [8] ed osservazioni personali, rappresenta il momento di maggiore sensibilità a stimolazioni sia fisiche che chimiche.

In totale sono stati saggiati 352 embrioni in tre serie di esperimenti successivi per 30, 60 e 120 mn. di trattamento, subito dopo si eseguivano i preparati microscopici per schiacciamento, dopo fissazione e colorazione con carminio acetico. Di ogni preparato, sono state contate tutte le figure mitotiche presenti.

La significatività statistica dei dati numerici è stata ricavata dal test t di Student.

RISULTATI

I reperti ottenuti nelle tre serie di esperimenti sono riassunti nella Tabella I, nella quale si leggono nell'ordine: tempo di trattamento, relativo numero di embrioni nell'esperimento e nel controllo, numero e media per embrione delle tre fasi mitotiche osservate ed infine il numero di mitosi totali. La correlazione tra quest'ultime ed il tempo di trattamento è visualizzata nella fig. 1, nella quale è anche riportato il numero medio per embrione di profasi: nel grafico si può facilmente osservare l'incremento numerico di mitosi per embrione

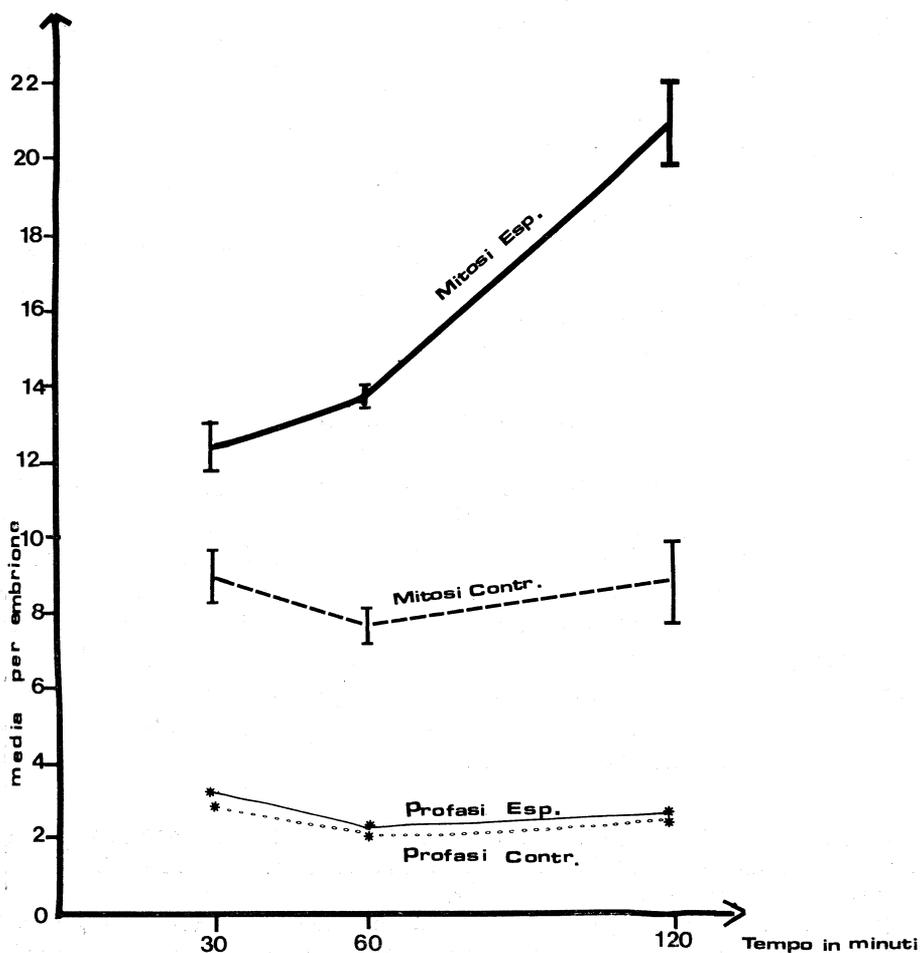


Fig. 1.

trattato in funzione del tempo e rispetto ai valori di controllo. Nei trattati infatti, dopo 30 min ⁽²⁾ si ha un aumento significativo, che si raddoppia dopo un'ora e si quadruplica dopo due ore. Il numero medio delle profasi per embrione, resta invece pressoché simile a quello dei controlli, anche al tempo di trattamento più lungo.

TABELLA I.

N° e media per embrione delle fasi del ciclo mitotico di cellule embrionali di A.a., sottoposte all'azione della 8-idrossichinolina (per 30, 60 e 120 minuti) e relativi controlli.

Tempo di trattamento (min)	N° embrioni	Fasi mitotiche osservate						Mitosi			
		prof.		metaf.		ana-tel.		n.	$\bar{x} \pm em$	P della diff.	
		n.	\bar{x}	n.	\bar{x}	n.	\bar{x}				
30	Esp.	51	165	3,2	373	7,3	98	1,9	636	$12,4 \pm 0,57$	< 0,02
	Contr.	51	145	2,8	205	4,0	104	2,0	454	$8,9 \pm 0,57$	
60	Esp.	73	171	2,3	732	10,0	101	1,3	1004	$13,7 \pm 0,31$	< 0,001
	Contr.	73	158	2,1	276	3,8	129	1,8	563	$7,7 \pm 0,34$	
120	Esp.	52	143	2,7	903	17,3	44	0,8	1090	$20,9 \pm 1,02$	< 0,001
	Contr.	52	134	2,6	216	4,1	110	2,1	460	$8,8 \pm 1,07$	

TABELLA II.

Rapporto fasi mitotiche/mitosi come indice di proliferazione, nei termini d'intervallo dei tempi di trattamento e rispetto ai controlli.

Tempo in minuti		Prof/mitosi	Metaf/mitosi	Ana-Telof. mitosi
30	Esp.	0,26	0,58	0,16
	Contr.	0,32	0,45	0,23
60	Esp.	0,17	0,73	0,10
	Contr.	0,28	0,49	0,23
120	Esp.	0,13	0,83	0,04
	Contr.	0,29	0,47	0,24

(2) Tempi di trattamento più brevi non provocano reazioni significative.

Nella Tabella II sono riportati i valori del rapporto tra il numero delle singole « fasi a cromosomi » osservate e quello delle mitosi totali (nell'esperimento e nel controllo) per ogni tempo di trattamento. La fig. 2 visualizza questi valori (riportati sulle ordinate in percentuale), evidenziando la variazione dinamica subita dalle tre fasi mitotiche al crescere del tempo di trattamento.

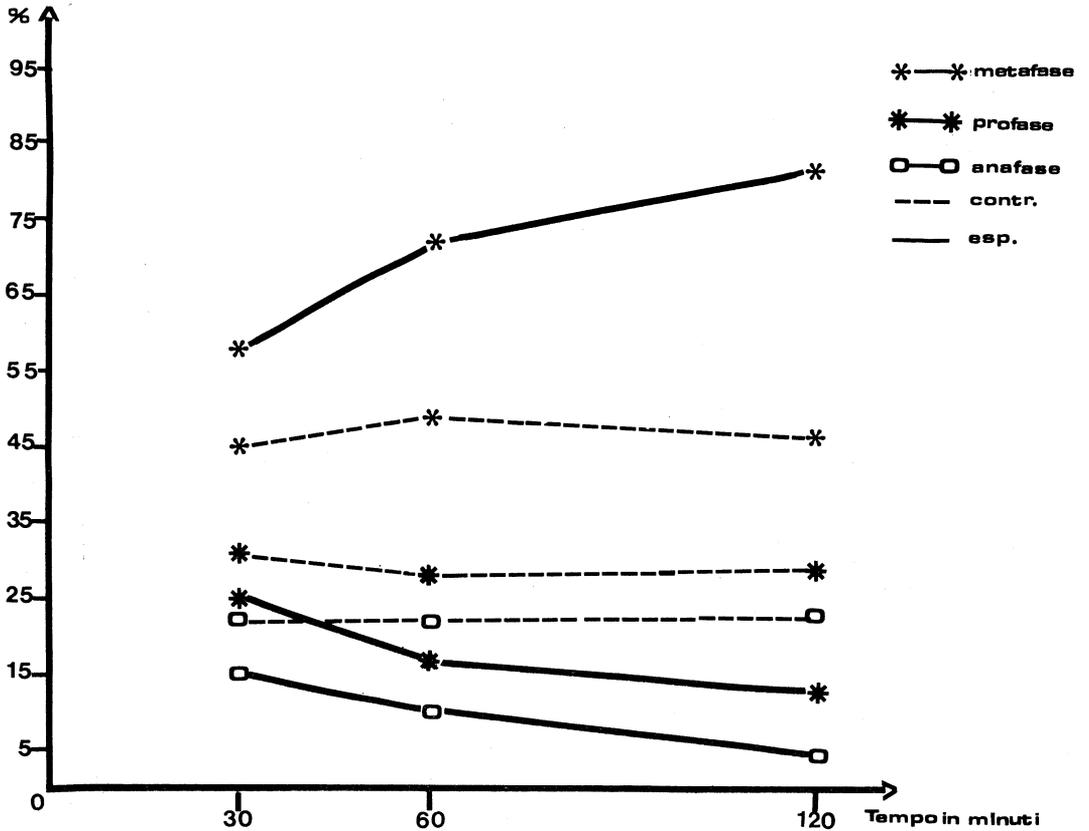


Fig. 2.

È interessante notare che il decremento (percentuale) profasico ed anafasico è correlato all'incremento delle metafasi (massimo valore raggiunto 83 %). L'aumento metafasico non è però esponenziale, portandosi dal 13 % in più rispetto ai controlli nella prima mezz'ora, al 24 % in più dopo un'ora e soltanto al 36 % in più dopo due ore. Corrispondentemente, gli stadi profasici ed anafasici dopo un'ora subiscono una rapida diminuzione (percentuale); in seguito (due ore) mostrano una flessione nel decremento.

Dal punto di vista cariologico non si osservano particolari alterazioni dei cromosomi, salvo un effetto di stickiness intercromatidico pronunciato che si manifesta, in proporzione al tempo di trattamento, su un crescente numero

di mitosi. Pertanto si osservano frequentemente figure meta-anafasiche in cui non si verifica la separazione dei cromatidi anche dopo la divisione del centromero (vedi Tav. I).

CONCLUSIONI E DISCUSSIONI

L'analisi globale dei reperti sperimentali permette di stabilire:

1) Le cellule embrionali di *Asellus aquaticus* L. sono sensibili all'azione della 8-idrossichinolina a tutti i tempi di trattamento usati;

2) il blocco metafaseico pressoché totale ed il rallentamento della velocità di passaggio da ana-telofase ad intercinesi, sono le manifestazioni più evidenti dell'azione antimitotica (crescente in proporzione diretta col tempo di trattamento) esercitata da questa sostanza sulla dinamica delle mitosi.

Non abbiamo per il momento effettuato un'analisi citologica del fuso, dell'aster e della centrosfera sul nostro materiale. Tuttavia la similitudine dei nostri risultati con quelli ottenuti da numerosi Autori che hanno somministrato la 8-idrossichinolina a cellule di *Allium cepa* [3, 4], di mammifero [5] e di anfibio urodelo [1, 2] ci permette di supporre che il meccanismo di azione di questa sostanza sia quello proposto dagli altri sperimentatori.

In questo contesto infatti, si possono collocare tutti i fenomeni osservati:

a) gli effetti di diversi tempi di trattamento non differiscono qualitativamente tra loro, ma a tempi più lunghi gli effetti si sommano;

b) il blocco metafaseico, a causa della distruzione delle fibre fusoriali già formate, è significativo dopo 30 minuti e pressoché totale dopo due ore di trattamento (tempi piuttosto brevi considerata la concentrazione relativamente bassa).

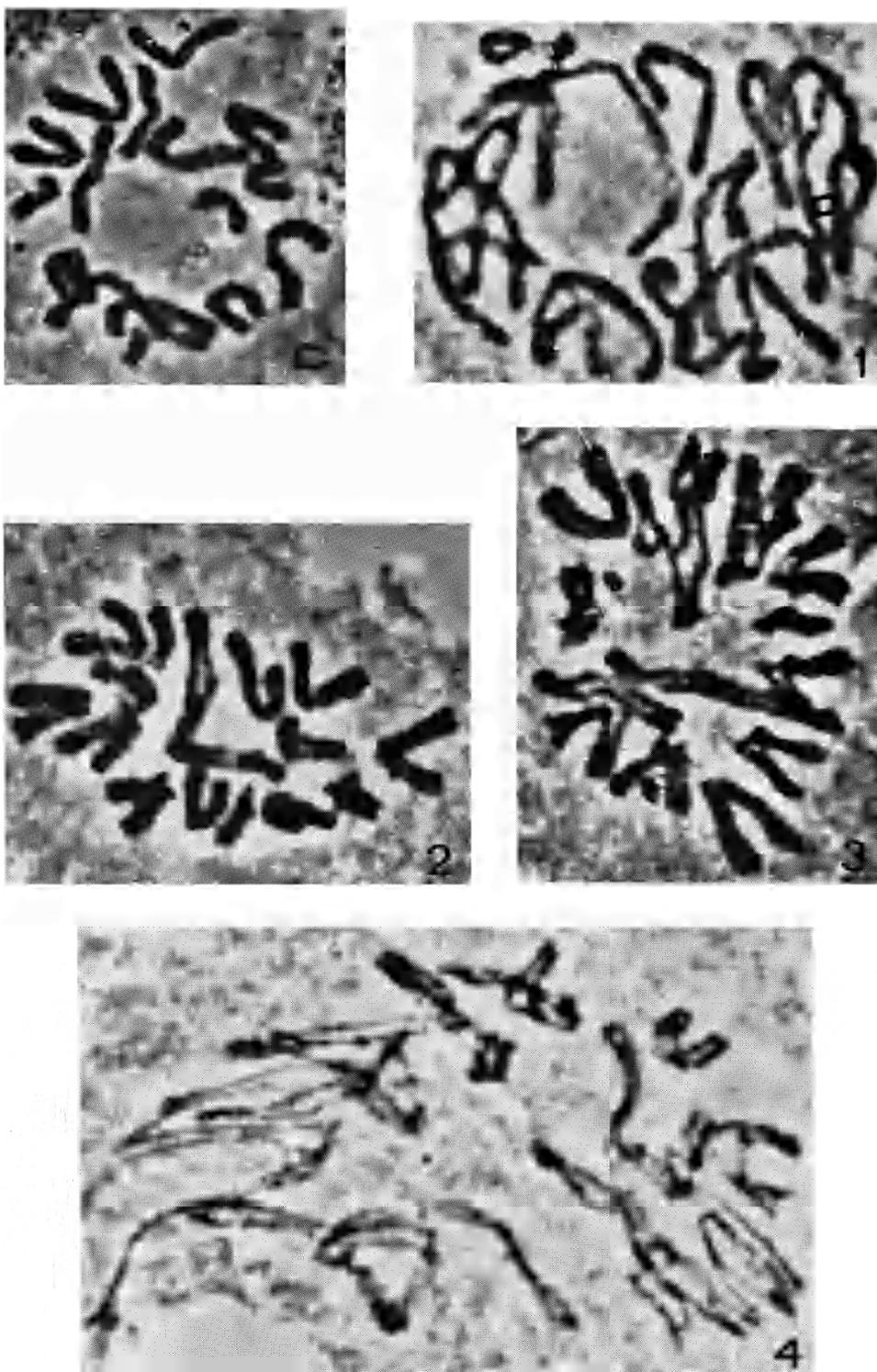
L'impossibilità di proseguire ad anafase e da ana-telofase ad intercinesi, indica l'assenza o perlomeno l'inefficacia totale dell'apparato acromatico.

Per contro non è stata notata difficoltà del passaggio da profase a metafase (quest'ultime infatti aumentano proporzionalmente al tempo), nè un effetto tossico tale da impedire l'entrata in mitosi dei nuclei intercinesi (probabilmente per la brevità dei tempi di esperimento relativamente alla durata del ciclo cellulare in *Asellus*); infatti anche dopo due ore di trattamento il numero di profasi per embrione si mantiene costantemente prossimo a quello osservato nei controlli.

Per quanto riguarda l'alterazione cariologica, si osserva che essa rientra nel quadro delle anomalie descritte dai vari Autori [1, 3, 4] e la sua genesi è interpretabile in base alle teorie da questi elaborate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. SENTEIN (1963) - *L'action de la quinoline sur les mitoses de segmentation*, « C. R. Acad. Sc. (Paris) », 256, 4759-4761.
- [2] P. SENTEIN (1970) - *Action de la quinoline sur les mitoses de segmentation des oeufs d'Urodèles: le blocage de la centrosphère*, « Chromosoma (Berl.) », 32, 97-134.
- [3] J. K. TJIO e A. LEVAN (1950) - *The use of oxyquinoline in chromosome analysis*, « Anal. Estacion exp. Aula Dei », 2, 21-61.
- [4] A. MILOSSKY (1960) - *Osservazioni sull'attività citologica delle sostanze chinoliniche*, « Caryologia », 12, 439-481.
- [5] P. GOUGET (1970) - *Action de la 8-hydroxyquinoline sur la segmentation de l'oeuf de Souris in vitro*, « C. R. Soc. Biol. », 7, 1556-1558.
- [6] M. DI CASTRO, E. MARCHETTI e A. ROCCHI BRASIELLO (1973) - *Studio del cariotipo di Asellus aquaticus per mezzo delle tecniche della tripsina e della fluorescenza*, « Rend. Acc. Naz. dei Lincei », 55, 116-118.
- [7] L. ROSSI, A. MANASSERO e G. VITAGLIANO TADINI (1975) - *Cure parentali marsupiali in Asellus aquaticus L. (Crust. Isop.)*, « Rend. Accad. Naz. dei Lincei », 58, (3), 433-440.
- [8] G. VITAGLIANO TADINI e A. DE CAPOA (1962) - *Dati preliminari sull'azione dei raggi X sugli embrioni di Asellus aquaticus L.*, « Atti della Soc. Peloritana di Sc. fis. nat. e mat. », 8, 133-143.



C) Metafase di controllo: 1) Profase contratta. 2) Metafase (adesione intercromatidica),
3) Anafase. 4) Metafase despiralizzata.