
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GUIDO PALLADINI, VITO MARGOTTA, ANTONIO CAROLEI

**Studio sulla sensibilità al rame dei neuroni
dopaminergi: azione sul sistema nervoso di *Dugesia
gonocephala* s.l.**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.4, p. 523–528.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_4_523_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/>

Biologia. — *Studio sulla sensibilità al rame dei neuroni dopaminergici: azione sul sistema nervoso di Dugesia gonocephala s.l.* Nota di GUIDO PALLADINI (*), VITO MARGOTTA (**), e ANTONIO CAROLEI (***), presentata (****) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY.—The treatment of specimens of flatworms (*Dugesia gonocephala s.l.*) (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) with very diluted copper solutions shows initially an increase of dopamine-like activity and thereafter a complete paralysis of the same.

The morphological substrate of such an activity consists in evident damages with copper-soaking of neurons.

These data are in accordance with the high sensibility towards copper ions obtained in the nigro-striatal dopaminergic system of higher Vertebrates.

The Authors discuss the physiological significance of their observation, as far as the investigation of the functional role of copper upon the nervous system is concerned.

INTRODUZIONE

In una serie di lavori precedenti (Palladini *et al.*, 1973, 1974 a, 1974 b, 1974 c, 1975) ci si è occupati delle relazioni che intercorrono tra la funzionalità dei gangli della base, e del sistema extrapiramidale in generale (nel senso di Wilson, 1914), ed il ruolo che hanno gli Cu^{++} sul metabolismo nervoso. Tali indagini sperimentali, condotte sia mediante somministrazione di sostanze che, interferendo con la proteina di trasporto del metallo (ceruloplasmina), determinano un cospicuo innalzamento del tasso di rame libero nell'organismo, sia mediante inoculazione diretta intratecale di sali di rame, hanno permesso di osservare la peculiare sensibilità al metallo in questione di questo settore del sistema nervoso centrale, costituito, come è ben noto, prevalentemente da neuroni dopaminergici (Bertler e Rosengren, 1959; Yoshida, 1974).

In altra precedente Nota (Margotta *et al.*, 1975), il nostro gruppo di ricerca ha messo in luce le possibilità offerte dallo studio del sistema nervoso di una Planaria, la *Dugesia gonocephala s.l.* (Platheminthes, Turbellaria, Tricladida), rivelatosi, agli studi istochimici e neurofarmacologici, come un sistema in equilibrio dopaminergico-colinergico molto simile, quindi, per struttura, mediatori chimici coinvolti e reattività, all'extrapiramidale dei Mammiferi (Carolei *et al.*, 1976; Palladini *et al.*, 1976).

Abbiamo perciò ritenuto interessante saggiare la risposta di questo modello all'azione cuprica, nella speranza di poterne trarre nuove informazioni.

(*) Istituto di Biologia e Zoologia generale dell'Università di Roma.

(**) Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma.

(***) I Clinica delle Malattie Nervose e Mentali dell'Università di Roma.

(****) Nella seduta del 10 aprile 1976.

MATERIALE E METODI

Planarie (Platheminthes, Turbellaria, Tricladida) della specie *Dugesia gonocephala s.l.*, forma agama scissipara, provenienti dal nostro allevamento di esemplari raccolti inizialmente in località Rovine Canale Monterano (Roma), lungo il corso del fiume Mignone, sono state trattate con concentrazioni crescenti di $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ disciolto in acqua distillata. Per l'esperienza è stata scelta la concentrazione massima che permettesse una sopravvivenza degli individui per circa 7 ore; tale concentrazione è risultata pari a 1 mg/100 ml (0,25 mg/100 ml di Cu^{++}). Planarie di controllo sono state tenute in acqua distillata per lo stesso periodo di tempo. Le planarie di controllo e quelle trattate sono state poste in camera termostatica a temperatura (18 °C) costante ed al buio.

Tutti gli esemplari, di controllo e trattati, sono stati costantemente osservati, per l'intera durata dell'esperienza, con un microscopio binoculare Wild e le attività motorie più rimarchevoli degli individui trattati sono state riprodotte in disegni, confrontandole con il comportamento degli individui di controllo.

Al termine dell'esperienza, gli esemplari, sia di controllo che trattati, sono stati fissati parte in Bouin per la colorazione di Nissl (Windle *et al.*, 1943) e parte in alcool 70° saturo di H_2S per la rivelazione del rame secondo Timm (Ganther e Jolles, 1969).

Tutti gli esemplari fissati, dopo disidratazione ed inclusione in paraffina, sono stati sezionati al microtomo rotativo a 10 μ di spessore, secondo il piano trasversale, per l'allestimento di preparati seriat.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Osservazioni comportamentali.

Gli esemplari, posti nella soluzione cuprica, inizialmente si muovono come di norma, ma dopo poco tempo dall'inizio del trattamento cominciano ad allungarsi straordinariamente per poi assumere il tipico atteggiamento a spirale. Un analogo movimento spiraliforme si è manifestato nelle sperimentazioni da noi compiute, fino ad oggi, come la diretta conseguenza della somministrazione di sostanze dotate di proprietà dopaminergiche (Margotta *et al.*, 1975; Carolei *et al.*, 1976; Palladini *et al.*, 1976).

Più tardi gli animali divengono ipomobili, per poi immobilizzarsi, appiattiti e contratti a disco (fig. 1 nel testo): a tal punto, tutti gli esemplari sono però ancora capaci di muoversi, se stimolati energeticamente.

Successivamente, la paralisi diviene completa e, dopo 7-9 ore dall'inizio del trattamento, gli esemplari muoiono.

Osservazioni istologiche.

Le planarie trattate mostrano, con la colorazione di Nissl, evidenti alterazioni delle cellule nervose del « cervello », sia a livello nucleare, con figure picnotiche, che citoplasmatico, con swelling e vacuolizzazione (Tav. I, fig. 2), non osservabili nei controlli (Tav. I, fig. 1).

All'esame istochimico per la rilevazione del rame (Tav. I, figg. 3, 4, e 5), si osserva che numerose cellule nervose degli esemplari trattati sono impregnate dal metallo, sia a livello del pericarion che dei prolungamenti.

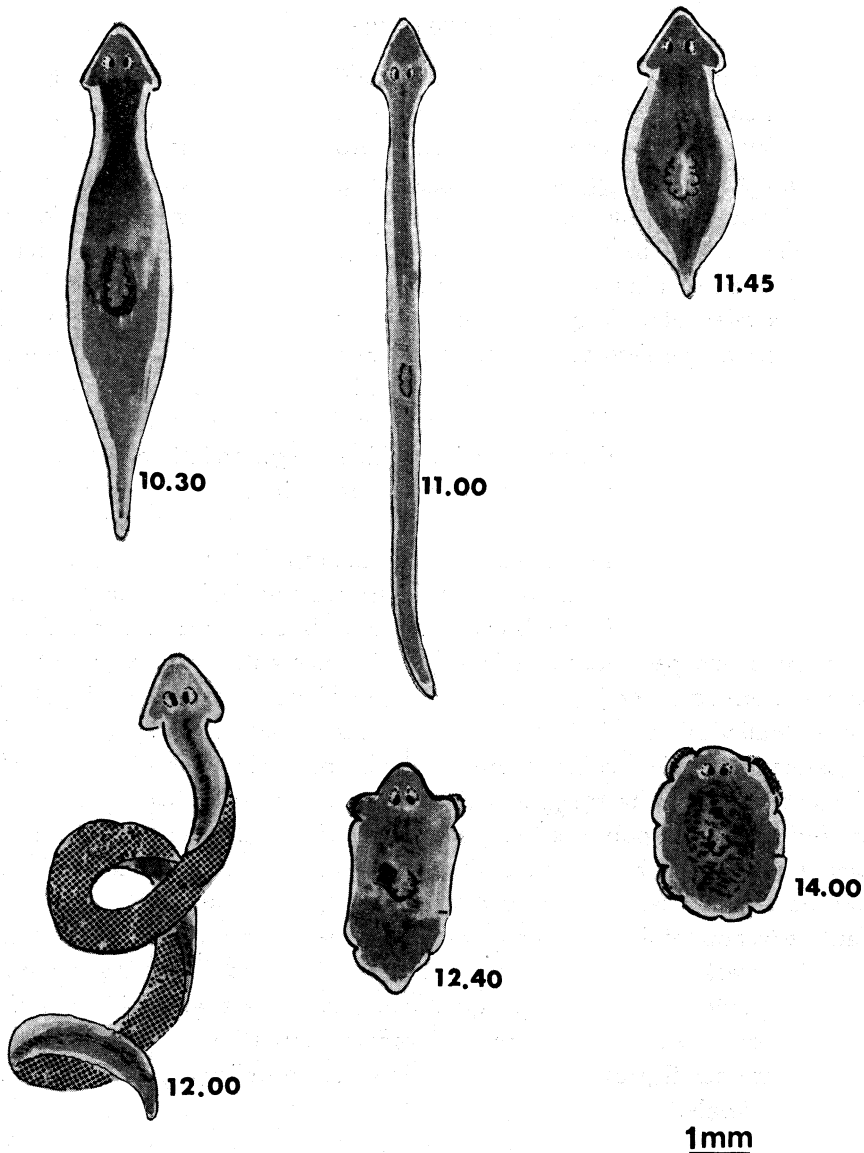


Fig. 1. - *Dugesia gonocephala s.l.* all'inizio del trattamento con rame (ore 10.30). Si osservi l'arrotolamento a spirale su due piani, caratteristico della stimolazione dopaminergica (ore 12.00) e lo stato successivo di immobilità in contrazione (ore 14.00). Disegno dal vero di un esemplare osservato al microscopio binoculare. $\times 10$.

Le cellule del parenchima appaiono, invece, prive del metallo che si visualizza solo a livello dell'epidermide. Si osserva, altresì, un aumento dei granuli riducenti l'argento, eventualmente interpretabili come figure pre-melanosomiche, sulla base di altre nostre osservazioni in corso. Nessun quadro simile è riscontrabile negli esemplari di controllo.

DISCUSSIONE

I dati forniti dal presente esperimento confermano quanto ci era già noto circa la particolare sensibilità al rame delle cellule nervose dopaminergiche. Ciò è in perfetto accordo con quanto è riportato dalla letteratura, sia in condizioni sperimentali che di patologia spontanea: infatti, l'introduzione di minime quantità di rame a livello striatale scatena un comportamento motorio peculiare nei Mammiferi che non è provocato da altri metalli pesanti (Butcher e Fox, 1968), mentre l'introduzione intracranica dello stesso in animali quali gli Uccelli, a telencefalo in gran parte di natura striatale, provoca convulsioni e morte a dosi anche lievissime (Peters e Walshe, 1966). D'altro canto è noto che nell'impregnazione cuprica di altri organi e del sistema nervoso, che avviene nella malattia di Wilson per deficit genetico della proteina di trasporto (ceruloplasmina) le lesioni sono quasi specifiche degli striati, pur essendo, in tali casi, il tasso dell'elemento pressoché uniforme in tutti i distretti (Lowenthal, 1958).

I dati ottenuti sperimentalmente da uno di noi sui Mammiferi sono risultati del pari concordanti, in quanto si è evidenziata una lesione quasi selettivamente extrapiramidale, sia nell'avvelenamento da azide con consecutivo alto tasso di Cu libero per blocco della capacità veicolante della ceruloplasmina (Curzon e Cumings, 1966), sia mediante iniezione intratecale di soluzioni rameiche (Palladini *et al.*, 1973, 1974 a, 1974 b, 1974 c, 1975).

L'osservazione del comportamento della planaria *Dugesia gonocephala* s.l. ci mostra, con molta maggior chiarezza di quanto non fosse possibile nei Mammiferi, confermando così la validità sperimentale del nostro modello (Carolei *et al.*, 1976), che il rame si fissa elettivamente su questi neuroni, come dimostrano i quadri istochimici, provocando alterazioni aspecifiche che, però, risultano sovrapponibili a quanto osservato nell'extrapiramidale del ratto, iniettato intratecalmente (Palladini *et al.*, 1975). Sotto il profilo comportamentale, il quadro è inizialmente quello dell'aumentata attività dopaminergica (Margotta *et al.*, 1975), forse a significato irritativo, cui fanno seguito, verosimilmente per il progredire dell'avvelenamento dei neuroni, l'ipomobilità e la paralisi finale.

Non possiamo ancora che speculare sulla ragione di questa peculiare sensibilità, che possiamo riportare al concetto di patoclisi secondo C. e O. Vogt (1922), dei neuroni dopaminergici al rame. Allo stato normale, almeno nei Mammiferi, esiste una certa cuprofilia selettiva delle strutture dopaminergiche, sia nell'uomo che nel ratto, anche se non concordemente ammessa da tutti gli Autori (Donaldson *et al.*, 1973; Ule *et al.*, 1974; De Falco e Campanella, 1975; Goody *et al.*, 1975). Queste strutture sono però certamente ricche in metallo-enzimi rameici (De Falco e Campanella, 1975), quali la tirosinaidrossilasi (TH) e la dopamina- β -idrossilasi (Evans, 1973), ed è nota l'importanza della formazione di complessi Cu^{++} -ATP-ammine biogene sia per il trasporto che per l'accumulo (Rajan *et al.*, 1974).

Rimane pertanto suggestiva l'ipotesi che i neuroni dopaminergici possiedano uno specifico o più attivo meccanismo di trasporto del metallo destinato alla sintesi degli enzimi specifici del metabolismo intermedio delle amine biogene, il quale è responsabile della loro cuprofilia e, in presenza di un eccesso di metallo « libero », non veicolato da proteine di trasporto, dell'eccesso, tossico, del metallo del loro interno.

Su tale linea ci riproponiamo di indirizzare le nostre ricerche in avvenire.

BIBLIOGRAFIA

- BERTLER Å. e ROSENGREN E. (1959) - « *Experientia* », 15, 10.
BUTCHER L. L. e FOX S. S. (1968) - « *Science* », 160, 1237.
CAROLEI A., MARGOTTA V. e PALLADINI G. (in stampa) - « *Neuropsychobiology* ».
CURZON G. e CUMINGS J. N. (1966) - In: *The biochemistry of copper* (Peisach J., Aisne P. and Blumberg W. E. eds.), p. 545, Academic Press, New York.
DE FALCO F. A. e CAMPANELLA G. (1975) - « *Acta Neurol.* » (Na), 30, 121.
DONALDSON J., ST-PIERRE T., MINNICH J. e BARBEAU A. (1973) - « *Canad. J. Biochem.* », 51, 87.
EVANS G. W. (1973) - « *Physiol. Rev.* », 53, 535.
GANTHER P. e JOLLES G. (1969) - *Histochemie normale et pathologique*, Gauthiers-Villar, Paris.
GOODY W., HAMILTON E. I. e WILLIAMS T. R. (1975) - « *Brain* », 98, 65.
LOWENTHAL A. (1958) - *Composition du cerveau en certains éléments minéraux et essai sur leur signification en pathologie*, « *Acta Medica Belgica* », Bruxelles.
MARGOTTA V., PALLADINI G., CAROLEI A. e CONFORTI A. (1975) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 59, 201.
PALLADINI G., REITANO M. e VENTURINI G. (1973) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 54, 84.
PALLADINI G., REITANO M., VENTURINI G., CONFORTI A. e TARQUINI D. (1974 a) - *VIIth Intern. Congr. Neuropath.* p. 497, « *Excerpta Medica* », Amsterdam.
PALLADINI G., VENTURINI G., CONFORTI A., MEDOLAGO L. e REITANO M. (1974 b) - « *Acta Neurol.* » (Na), 29, 417.
PALLADINI G., VENTURINI G., ANGELERI S., AGNOLI A. e CONFORTI A. (1974 c) - *I Riunione Lega It. Lotta morbo di Parkinson e malattie Extrapiram.*, p. 105.
PALLADINI G., PISTONE A. e ZELAZEK S. (1975) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 58, 64.
PALLADINI G., MARGOTTA V., CAROLEI A. e CONFORTI A. (1976) - « *Acta Neurol.* » (Na), 31, 1.
PETERS R. A. e WALSHE J. M. (1966) - « *Proc. Roy. Soc. London* », B 166, 273.
RAJAN K. S., DAVIS J. M. e COLBURN R. W. (1974) - « *J. Neurochem.* », 22, 137.
ULE G., VOLK A. e BERLET H. (1974) - « *Z. Neurol.* », 206, 117.
VOGT O. e VOGT C. (1922) - « *J. Psych. Neurol.* », 28, 1.
WILSON S. A. K. (1914) - « *Brain* », 36, 427.
WINDLE W. F., RHINES R. e RANKIN J. (1943) - « *Stain Techn.* », 18, 77.
YOSHIDA M. (1974) - « *Confinia Neurol.* », 36, 282.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - «Cervello» di *Dugesia gonocephala s.l.* di controllo, sezione trasversa. Neuroni alla periferia del neuropilo. Colorazione Nissl (luce monocromatica 5630 Å).
- Fig. 2. - «Cervello» di *Dugesia gonocephala s.l.* trattata con Cu, sezione trasversa. Neuroni alla periferia del neuropilo. Si osservino picnosi nucleari (frecce) e vacuolizzazione citoplasmatica (asterischi). Colorazione Nissl (luce manocromatica 5630 Å).
- Fig. 3. - Sezione trasversa a livello del «cervello» di *Dugesia gonocephala s.l.* trattata con Cu. Reazione istochimica per i metalli pesanti, sec. Timm. Si osservi la precipitazione del rame a livello dell'epidermide (frecce), dei neuroni e dei loro prolungamenti nel neuropilo (N). Tale precipitazione non è visibile nelle cellule della gastrodermide (G). I numerosi piccoli granuli neri sono verosimilmente interpretabili come pre-melanosomi e melanosomi.
- Figg. 4, 5. - Neuroni e loro prolungamenti, impregnati dal rame, in esemplari di *Dugesia gonocephala s.l.* trattati, a forte ingrandimento.

Il tratto in calce alle fotografie vale 10 µ.

